

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I  
(Nutrición)



## TESIS DOCTORAL

**Derivados cárnicos con algas. implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Adriana Rita Schultz Moreira**

Directores

Francisco José Sánchez Muniz  
Juana Benedí González  
Sara Bastida Codina

**Madrid, 2014**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)

**DERIVADOS CÁRNICOS CON ALGAS. IMPLICACIONES SOBRE EL  
METABOLISMO LIPOPROTEICO, ESTATUS ANTIOXIDANTE Y  
PROTECCIÓN HEPÁTICA.**

Memoria presentada por **Adriana Rita Schultz Moreira** para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores: Dr. Francisco José Sánchez Muniz,

Dra. Juana Benedí González,

Dra. Sara Bastida Codina.

Madrid, Octubre de 2013.





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)

**MEAT PRODUCTS ADDED WITH ALGAE. IMPLICATIONS ON  
LIPOPROTEIN METABOLISM, ANTIOXIDANT STATUS AND LIVER  
DAMAGE PROTECTION.**

Memoria presentada por **Adriana Rita Schultz Moreira** para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores: Dr. Francisco José Sánchez Muniz,

Dra. Juana Benedí González,

Dra. Sara Bastida Codina.

Madrid, Octubre de 2013.



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN**

**Francisco José Sánchez Muniz**, Catedrático del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, **Juana Benedí González**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y **Sara Bastida Codina** Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICAN:** Que el presente trabajo titulado “Derivados cárnicos con algas. Implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática” constituye la memoria que presenta la Licenciada Adriana Rita Schultz Moreira para optar al grado de Doctor y ha sido realizado en los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección. Asimismo, en el marco del proceso de evaluación requerido, damos nuestro consentimiento para su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a veintiuno de octubre de dos mil trece.

Dr. Francisco J Sánchez Muniz

Dra. Juana Benedí González

Dra. Sara Bastida Codina



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN**

El trabajo de investigación que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al amparo de los Proyectos AGL 2008-05-07204-C02-01/ALI, AGL 2008 04892-C03-02, y AGL 2011-25644-C02-02 de la Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia. Así mismo, ha sido parcialmente financiado por el Proyecto Consolider-Ingenio 2010 referencia CSD 2007-00016.

Adriana Rita Schultz Moreira ha disfrutado de una beca de la Universidad Complutense de Madrid durante los cursos académicos 2007-2011 y ha realizado estancias cortas del 18 de septiembre al 17 de diciembre de 2009 en Belfast (Reino Unido) y en Davis (Estados Unidos) del 24 de marzo al 22 de Junio de 2011.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera dar las gracias a todas las personas que me han ayudado, de una u otra forma, a realizar esta Tesis Doctoral. En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, Francisco José Sánchez Muniz, Juana Benedí González y Sara Bastida Codina su incondicional apoyo y dedicación, consiguiendo que este trabajo de investigación se materializara en mi Tesis. Gracias, muchas gracias por compartir conmigo conocimientos, cariño y simpatía, y por incentivarme a querer y buscar siempre lo mejor.

A los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en los que he realizado la mayoría de los estudios, sin olvidar a la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido una beca pre-Doctoral que permitió mi estancia y gastos en Madrid y en el extranjero durante un total de cuatro años. También agradecer la subvención de los Proyectos AGL 2008-05-07204-C02-01/ALI, AGL 2008 04892-C03-02, y AGL 2011-25644-C02-02 de la Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia, así como al Proyecto Consolider-Ingenio 2010 referencia CSD 2007-00016 que financió parcialmente las investigaciones y las publicaciones de los resultados que se recogen en la tesis.

Especial mención merecen todos los miembros de dichos Departamentos, incluyendo a mis compañeros de doctorado e investigación, Raúl, Laura, Ireni, María, Alba, Jorge, Andrea, Miguel, Patricia, Adil, Elena, Ana, Tarek 1, Tarek 2, Dora, Paloma, Eduardo, Rory, Karim, Natalia, Meritxell, Bricia, Araceli, Wilma, Arantxa, M<sup>a</sup> Ángeles, Mirandeli...

I would like to thank Dr. Brian Green for accepting me in his laboratory. Gracias a mi supervisor Dr. Brian Green, en Belfast, Reino Unido, por aceptarme en su laboratorio para acceder al Doctorado con mención Europea; y a mi supervisora Dra. Allyson Michell, en Davis, Estados Unidos, por aceptarme en su laboratorio. Ambas estancias han incrementado mis conocimientos en diversas áreas de conocimiento.

Muito obrigada a meus pais, família e amigos por estar sempre ao meu lado me animando e me apoiando.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA DE LA DIETA Y LA NUTRICIÓN SOBRE LA SALUD	1
1.2. ALIMENTOS FUNCIONALES	2
1.3. PRODUCTOS CÁRNICOS COMO ALIMENTOS FUNCIONALES	3
1.4. ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE CARNE Y DERIVADOS MÁS SALUDABLES	6
1.5. ALGAS MARINAS	8
1.6. DIGESTION DE HIDRATOS DE CARBONO. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL SISTEMA MALTASA Y DE LA DIFUSIÓN DE GLUCOSA. REPERCUSIONES EN LA SALUD	8
1.7. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	13
1.7.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	14
1.7.1.1. Superóxido dismutasa	14
1.7.1.2. Catalasa	15
1.7.1.3. Glutation peroxidasa	16
1.7.1.4. Glutation reductasa	17
1.7.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	18
1.7.2.1. Vitamina E	18
1.7.2.2. Carotenoides	19
1.7.2.3. Ácido ascórbico	19
1.7.2.4. Glutation	19
1.8. METABOLISMO LIPOPROTEICO	21
1.9. HÍGADO. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES DESTACABLES.	30
1.10. PAPEL DE LA DIETA EN LA SALUD CARDIOVASCULAR	36
1.10.1. Efectos de las algas y de los componentes de las algas sobre los niveles plasmáticos de colesterol y lipoproteínas. Efectos antitrombóticos	44
1.10.2. Efecto de las algas y sus compuestos sobre la presión arterial	52
1.10.3. Propiedades antioxidantes de las algas marinas y sus componentes	54
1.11. EFECTOS DEL COLESTEROL DIETÉTICO SOBRE EL ESTATUS ANTIOXIDANTE Y EL PERFIL LIPOPROTEICO	58
1.12. INTERACCIÓN DIETA-GENÉTICA	59
1.13. IMPORTANCIA Y FACTORES QUE CONDICIONAN LA LIPOGÉNESIS Y LIPOLISIS	61

EN EL TEJIDO ADIPOSO	
2. INTERÉS DEL ESTUDIO	66
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
4. MATERIALES Y MÉTODOS	68
4.1. MATERIA PRIMA	68
4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE ALGAS	68
4.3. ESTUDIOS IN VITRO CON EXTRACTOS DE ALGAS	69
4.4. PREPARACIÓN DE LOS REESTRUCTURADOS CÁRNICOS	70
4.5. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS	71
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	74
4.7. METODOS ANALÍTICOS	74
4.7.1. Ingesta dietética e índice de eficacia alimentaria	74
4.7.2. Obtención de muestras	74
4.7.3. Perfil antioxidante	75
4.7.3.a. Determinación de antioxidantes no enzimáticos: Sistema del Glutation	75
4.7.3.b. Índice redox	75
4.7.3.c. Determinación de malondialdehído	75
4.7.4. Marcadores de daño hepático	76
4.7.5. Concentración de proteínas en el hígado	76
4.7.6. Antioxidantes enzimáticos. Actividad enzimática	76
4.7.6.1. Superóxido dismutasa en hígado	76
4.7.6.2. Catalasa hepática	76
4.7.6.3. Glutation peroxidasa hepática	77
4.7.6.4. Glutation reductasa hepática	77
4.7.7. Arilesterasa en plasma	78
4.7.8. Expresión génica de enzimas antioxidantes y no antioxidantes. Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR)	78
4.7.9. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)	80
4.7.10. Lípidos y lipoproteínas	83
4.7.10.1. Determinación de lípidos en plasma y lipoproteínas	83

4.7.10.2. Aislamiento y determinación de lipoproteínas.	83
4.7.10.3. Extracción grasa del tejido adiposo y del tejido hepático	84
4.7.10.4. Determinación del colesterol en el hígado	84
4.7.11. Estudio histológico	84
4.7. 12. Aislamiento de hepatocitos	85
4.7.13. Contenido de ADN y evaluación del ciclo celular	85
4.7.14. Actividad de la caspasa-3	86
4.7.15. Valoración de la apoptosis: citocromo c	86
4.7.16. Método estadístico	86
5. EXPOSICIÓN DE RESULTADOS/PUBLICACIONES	88
5.1. PUBLICACIÓN Nº 1.	89
5.2. PUBLICACIÓN Nº2.	101
5.3. PUBLICACIÓN Nº 3.	129
5.4. PUBLICACIÓN Nº 4.	139
5.5. PUBLICACIÓN Nº5.	148
5.6. PUBLICACIÓN Nº6	157
5.7. PUBLICACIÓN Nº7.	168
5.8. PUBLICACIÓN Nº8.	177
6. DISCUSIÓN	207
6.1. Estudio de la aceptabilidad de los cárnicos reestructurados con algas. Efectos sobre ingesta dietética, índice de eficacia alimentaria y crecimiento	207
6.2. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos con algas sobre el sistema antioxidante y la expresión génica.	208
6.3. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos sobre el perfil lipoproteico	215
6.4. Efectos del consumo de cárnicos reestructurados sobre la estructura y morfología del hígado	223
6.5. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos con algas y del colesterol dietético sobre las enzimas lipogénicas y lipolíticas del tejido adiposo.	227
6.6. Efectos del consumo a corto plazo de dietas enriquecidas en colesterol y reestructurados cárnicos sobre el ciclo celular y la apoptosis	231
6.7. Efectos in vitro de extractos de algas sobre dos etapas de la digestión y absorción de hidratos de carbono	234
6.8. DICUSIÓN INTEGRADORA	239

6.9. INTEGRATED DISCUSSION	243
7.RESUMEN Y CONCLUSIONES	247
8. SUMMARY AND CONCLUSIONS	250
9. BIBLIOGRAFIA	253



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABCA1: Transportador “ATP binding cassette” tipo A1

ALT: Alanin aminotransferasa

ALP: Fostatasa alcalina

AST: Aspartato aminotransferasa

AG: ácidos grasos

AGM: Ácidos grasos monoinsaturados

AGP: Ácidos grasos poliinsaturados

AGS: Ácidos grasos saturados

AGT: Ácidos grasos trans

APO: apolipoproteína

CAT- Catalasa

CE: Colesterol esterificado

CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol

CL: Colesterol libre

CLA: Ácido linoleico conjugado

DM: Diabetes mellitus

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EL: Lipasa endotelial

FAD: Flavin adenin dinucleotido

FL: Fosfolípidos

GPx: Glutation peroxidasa

GPx-no-Se: Glutation peroxidasa no dependiente de selenio

GPx-Se: Glutation peroxidasa dependiente de selenio

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutathión oxidado

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HDLn: HDL nacientes

HL: Lipasa hepática

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

LCAT: Lecitín-colesterol-acil transferasa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LPL: Enzima lipoproteín-lipasa

LPR: Receptor de lipoproteínas para quilomicrones

NADP: Nicotina-adenín-dinucleótido

PLTP: Proteína transferidora de fosfolípidos;

QM: Quilomicrones

QMr: Quilomicrón residuo o quilomicrón remanente

RL: Radicales libres

SOD: Superóxido dismutasa

SRB1: Receptor “scavenger” tipo B1

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TG, Triglicéridos

TGRL: Lipoproteínas ricas en triglicéridos

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. IMPORTANCIA DE LA DIETA Y LA NUTRICIÓN SOBRE LA SALUD

Actualmente está ampliamente aceptada la relación entre dieta y salud, ya que ciertos problemas de salud tienen su origen en hábitos dietéticos y nutricionales incorrectos. La OMS definió hace tiempo el término salud como “Estado de bienestar físico, mental y social”, que es claramente algo más que ausencia de enfermedad. Según Lalonde (1974, citado por Belmonte, 2008) la salud sería la resultante de cuatro tipos de factores:

- Biológicos,
- Dependientes del medio ambiente,
- Que dependen del estilo de vida,
- Ligados al sistema sanitario

Estos factores según Belmonte (2008) son modificables y por ello, las acciones de la salud pública deben planificarse para modificarlos o para evitar su empeoramiento. Cuando hablamos del mantenimiento de la salud hay que considerar dos aspectos fundamentales y complementarios; por un lado **la prevención de la salud** dirigida a disminuir y controlar las enfermedades y por tanto los factores de riesgo, y está dirigida de manera individual a personas sanas y enfermas, y por otro la **promoción de la salud**, enfocada a toda la población sana y enferma y cuyo objetivo es lograr la salud y el bienestar mirando los factores condicionantes de la salud.

La OMS (2003) identificó 10 factores de riesgo claves para el desarrollo de enfermedades crónicas. Cinco de ellos: obesidad, sedentarismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia y el consumo insuficiente de frutas y verduras, están estrechamente relacionados con la alimentación y ejercicio físico. Por tanto parece evidente que una alimentación poco saludable es una de las causas más importantes de enfermedades crónicas ya que incide sobre 4 de estos 5 grandes factores de riesgo.

En las últimas décadas ha tenido lugar en el mundo desarrollado y en particular en España, un cambio radical en la forma de comer (Sánchez-Muniz y Bastida, 2013). Puede resumirse que desde la década de los 60 del pasado siglo se consumen en España más grasas y menos hidratos de carbono (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1992/95/97/2001/02 y 2003; Encuesta Española de Ingesta Dietética, 2011). Este cambio ha estado influido por diferentes aspectos entre los que cabe destacar la globalización, que ha inducido fuertes cambios en los hábitos de consumo tradicional de nuestra población, con un importante incremento del número de comidas

realizadas fuera de casa, la incorporación de la mujer al trabajo, la reducción del tiempo disponible y empleado para cocinar y en particular para la elaboración de platos “de cuchara” tan tradicionales en nuestra cultura culinaria, un importante aumento del consumo de productos industriales, de embutidos en las cenas, y de alimentos típicos y específicos de los fines de semana (Bastida, 2005). A ello también ha contribuido la facilidad de incorporar grasa baratas a productos industriales y a que la grasa de la dieta, junto con la sal y el azúcar, son los componentes de la dieta que más incrementan la palatabilidad, y por tanto la aceptabilidad de los alimentos. Estos cambios parecen estar relacionados con el importante incremento de sobrepeso y obesidad observado en nuestra población y con las implicaciones negativas que conllevan sobre la Salud Pública en España.

Todos estos aspectos han contribuido a la puesta en marcha de programas, como la Estrategia NAOS, para conseguir una alimentación más “magra” y reducir los aspectos negativos de la “nueva” forma de comer. Por otra parte, las deficiencias y desequilibrios en algunos componentes grasos de nuestra dieta pueden tener un impacto nutricional y sanitario de proporciones alarmantes y en muchos casos inesperados, por lo que la mejora y la educación nutricional pueden paliar de forma importante este tema de indiscutible trascendencia.

La relación entre dieta y aterosclerosis está mediada fundamentalmente por la influencia de aquella sobre la composición de las lipoproteínas y el estrés oxidativo, por eso esta Tesis centra sus objetivos en la inclusión de alimentos teóricamente saludables (algas) en la dieta, y en particular en un tipo de alimento (carne y derivados) cuyo consumo en cantidades elevadas no parece adecuado, bajo el punto de vista de salud cardiovascular, atendiendo a los datos de diferentes estudios epidemiológicos (Olmedilla y cols., 2013; Jiménez-Colmenero y cols., 2010). Esta integración alga-carne conduce al concepto de carne potencialmente funcional, cuyos aspectos centrales serán detallados en el apartado “1.2. Alimentos funcionales”.

## **1.2. ALIMENTOS FUNCIONALES**

El concepto de alimento funcional se originó en Japón en la década de los 80, desde donde se extendió a Estados Unidos y Europa. Fue el Primer Ministro de Salud y Bienestar de Japón quien estableció el concepto de Alimentos de Uso Específico para la Salud (Foods for Specific Health Use, FOSHU) en el año 1991. Los FOSHU son alimentos de los que, basados en el conocimiento sobre la relación entre salud y

alimentos o componentes de los mismos, se espera que generen beneficios sobre la salud y puedan ser autorizados para llevar en su etiquetado una alegación que exponga que una persona que los use pueda esperar un beneficio sobre la salud a través del consumo de estos alimentos (Arihara, 2004).

En Europa no fue hasta el año 1998 cuando se llegó a un consenso científico sobre la alimentación funcional. La Unión Europea a través de una Comisión sobre Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE) y con el apoyo del Instituto Internacional para las Ciencias de la Vida en Europa (International Life Science Institute, ILSI) elaboró un documento consenso donde establecieron las bases y conceptos necesarios para el desarrollo de este tipo de productos (Diplock y cols., 1999). Según FUFOSE se considera alimento funcional aquel que pueda demostrar de manera satisfactoria que afecta beneficiosamente a una o más funciones selectivas del organismo, además de aportar sus efectos nutritivos intrínsecos, de tal modo que resulte relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento, y debe demostrar sus efectos en las cantidades normales en las que habitualmente se consume en la dieta. No es un comprimido ni una pastilla, sino parte de un patrón normal de alimentación (Diplock y cols., 1999).

Diversas organizaciones internacionales también han propuesto definiciones de alimentos funcionales. A raíz de ellas cabe resaltar que dentro de este grupo de alimentos no solo hay que considerar aquellos que han sufrido una transformación en su composición (ya sea por métodos tecnológicos o biotecnológicos), sino que también se encuentran aquellos alimentos que de forma natural contienen compuestos bioactivos que provoquen efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor. La investigación en nutrición se enfrenta a algunos desafíos específicos como demostrar que tales alimentos pueden tener impacto en mantener o promover funciones de salud. También se evaluarán los efectos relacionados con el estado de enfermedad a través de criterios de valoración clínica adecuados y contrastados (Latulippe y cols., 2013; Olmedilla y cols., 2013; Jiménez-Colmenero y cols., 2010).

### **1.3. PRODUCTOS CÁRNICOS COMO ALIMENTOS FUNCIONALES**

La carne y los derivados cárnicos son parte esencial de la dieta, ya que aportan un gran número de nutrientes (proteínas, lípidos, vitaminas, minerales). La carne es una fuente fundamental de proteínas de alto valor biológico, equilibrada en aminoácidos esenciales,

que satisface los requerimientos fisiológicos del hombre. Así mismo es una buena fuente de hierro, cinc, fósforo, con cantidades significativas de elementos traza como selenio, magnesio y cobalto, y una excelente fuente de vitaminas del complejo B, como, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, ácido pantoténico, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, (Jiménez-Colmenero, 2007a; Olmedilla y cols., 2013). Tradicionalmente este alimento ha sido muy apreciado como alimento de óptimo valor nutricional, y su consumo ha estado siempre asociado a hábitos saludables. Sin embargo, en los últimos años esa apreciación ha cambiado, debido a las asociaciones epidemiológicas entre consumo de carne y sus derivados o algunos de sus componentes con incremento del riesgo de principales enfermedades en nuestra sociedad (enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertensión y obesidad) (Olmedilla y cols., 2013).

La industria cárnica, al igual que el resto de la industria alimentaria, ha tenido que adaptarse a la creciente demanda de productos que contribuyen teóricamente a mantener y/o lograr una salud óptima. Los consumidores han pasado de buscar alimentos que cumplan con los requerimientos nutricionales básicos a buscar, a través de la nutrición óptima, una mejora de la calidad de vida y de la salud. En tal sentido en los últimos años se están desarrollando productos que se caracterizan por poseer alguna de las siguientes características: prevenir o limitar la presencia de ciertos compuestos potencialmente perjudiciales (mediante cambios en su composición o procesado) y/o favorecer la presencia de determinadas sustancias (naturalmente presentes o adicionadas) que ejerzan un papel beneficioso en cuanto a salud se refiere (Jiménez-Colmenero y cols., 2001; Olmedilla y cols., 2013; Jiménez-Colmenero y cols., 2010).

Los derivados cárnicos funcionales por su diversidad (carnes modificadas, carnes reestructuradas, masas untables, embutidos, etc.) han logrado un sitio importante en un mercado emergente que busca y vende alimentos con “valor añadido” (Jiménez-Colmenero y cols., 2006; Olmedilla y cols., 2013).

Existen varias estrategias, entre ellas modificaciones cualitativas y cuantitativas para lograr un producto “funcional”. Las principales ventajas en términos de modificar la composición, consisten en cambiar los ingredientes tanto endógenos (cárnicos) como exógenos (no cárnicos). La idea básica es limitar la concentración de compuestos con efectos fisiológicos adversos e incrementar la concentración de aquellos con efectos beneficiosos (Jiménez-Colmenero y cols., 2001; Jiménez-Colmenero, 2007a; Sánchez-Muniz, 2004; Jiménez-Colmenero y cols., 2010).

**Tabla 1. Cárnicos e ingredientes que los hacen potencialmente funcionales**

	<b>Componentes y alegaciones empleadas</b>	<b>Productos</b>
<b>Composición lipídica</b>	Menos grasa, bajo en grasa, libre de grasa, x% libre de grasa, sin grasa animal añadida, 0% de grasa saturada, libre de grasa <i>trans</i> , menos colesterol, bajo en colesterol; Bajo en calorías; Con omega 3, con omega 3 y 6, extra omega 3. Con ácido linoleico conjugado (CLA)	Salchichas, hamburguesas, jamón cocido, pechuga de pavo, bacon, snacks, etc.
<b>Sales</b>	Menos sal, bajo en sal, sin sal añadida, 50% menos sodio, sin fosfatos, sin nitrito o nitrato añadido	Salchichas, jamón cocido, bacon, etc.
<b>Alergenos</b>	Sin gluten y sin lactosa, libre de gluten, libre de alérgenos	Salchicha de cerdo <sup>1</sup> , hamburguesas <sup>1</sup> , albóndigas <sup>1</sup> , jamón cocido, derivados de aves, etc.
<b>Proteínas, péptidos y aminoácidos</b>	Enriquecido con soja, con L-carnitina	Salchicha de cerdo <sup>1</sup> , jamón cocido, salami, etc.
<b>Prebióticos</b>	Prebiótico, fibra, fibra soluble	Salchichas, derivados de aves
<b>Probióticos</b>	<i>Bifidus</i> , bacterias probióticas	Chorizo, producto cárnico untable fermentado <sup>1</sup>
<b>Vitaminas</b>	Con vitaminas E y C, enriquecidos con 8 vitaminas	Salchichas, pastel de pavo, bacón de pavo, mortadela, jamón cocido, etc.
<b>Esteroles vegetales</b>	Enriquecidos con esteroles vegetales o estanoles	Salchichas, albóndigas de pollo, etc.
<b>Minerales</b>	Con calcio, con extra calcio	Pechuga de pavo, salchichas.

<sup>1</sup> Producto categorizados como FOSHU- Foods for specific health use (Japón). Ejemplos de productos cárnicos disponibles en el Mercado con especificaciones acerca de distintos componentes Fuente: Jiménez-Colmenero y cols.,(2005).

En la tabla adjunta (**Tabla 1**) se muestra un resumen representativo de alimentos e ingredientes alimentarios que se han incorporado a derivados cárnicos para lograr alimentos potencialmente funcionales.

Se considera que los alimentos vegetales por su composición y contenido en fibra y compuestos bioactivos son los más adecuados para ser incorporados, y que cuando se combinan con la matriz cárnica o con productos que contienen carne y derivados pueden dar lugar a un alimento con propiedades funcionales. Nuestro grupo de

investigación viene trabajando desde hace tiempo en este tópico y ha desarrollado y está desarrollando estudios, tanto en el hombre como en animales de experimentación, para demostrar la funcionalidad de cárnicos y productos cárnicos potencialmente funcionales. Así ha desarrollado estudios incorporando nuez (Jiménez-Colmenero y cols., 2010; AGL 2001-2398-C03); algas (Bocanegra y cols., 2009a; Sánchez-Muniz, 2012; AGL 2005-07204-C02-01) glucomanano y espirulina (AGL 2008-04892-C03-02 y Consolider Ingenio 2010 # CSD 2007-00016), antioxidantes (Pando, 2012 y AGL 2008-04892-C03-01); en ácidos grasos de origen marino y de consumo habitual en algunos grupos de población humana (AGL-2011-29644-C02-02). En ese contexto, los componentes bioactivos de las algas marinas ofrecen perspectivas prometedoras para el desarrollo de los cárnicos funcionales en las que se basa el desarrollo, hipótesis y resultados de esta Tesis.

#### **1.4. ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE CARNE Y DERIVADOS MÁS SALUDABLES**

Existen, fundamentalmente, dos tipos de estrategias que se utilizan para la obtención de carne y productos cárnicos potencialmente más saludables, éstas son:

1. Genéticas o nutricionales en relación con la producción animal,
2. Reformulación de productos cárnicos.

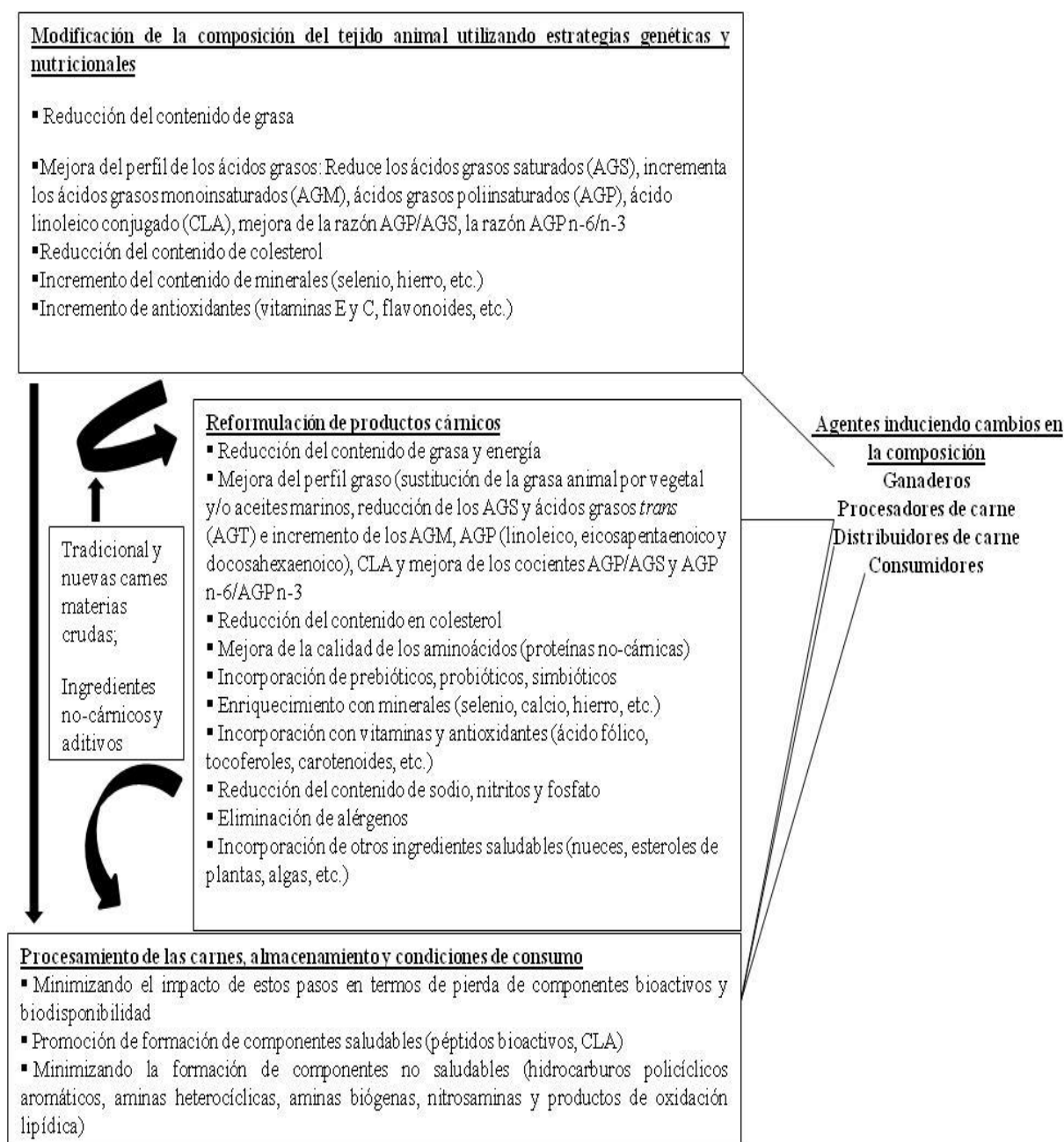
En esta memoria de Tesis Doctoral se hará especial hincapié en la reformulación de los productos cárnicos con algas marinas.

Para la obtención del cárnico funcional mediante la última estrategia, basada en la elaboración, se actúa principalmente a nivel de su reformulación, teniendo en cuenta estos aspectos:

- a) Reducción hasta límites apropiados de grasa, ácidos grasos saturados (AGS), sal, nitritos, etc.
- b) Incorporación de algunos ingredientes potencialmente beneficiosos para la salud (en esta Tesis se adicionaron tres especies diferentes de algas).
- c) Ambos procesos de reducción e incorporación comentados en los apartados a) y b).

En la **Figura 1** se presenta un compendio de los mecanismos que pueden utilizarse para obtener un cárnico funcional.





**Figura 1.** Aspectos centrales a tener en cuenta en el diseño y procesamiento de cárnicos potencialmente funcionales. Adaptado de Olmedilla y cols. (2013).

### **1.5. ALGAS MARINAS**

Las algas marinas son organismos fotosintéticos que poseen una estructura reproductiva sencilla. El número de especies de algas permanece aún sin determinar, pero se estima que es entre uno y diez millones (Metting, 1996). Las microalgas (algas unicelulares) incluyen las formas microscópicas del phylum Cyanophyta, clase Cyanophyceae, cuya evolución difiere de la de las macroalgas (FAO, 2006).

Además de por su estructura (pared celular, presencia o ausencia de flagelo), las macroalgas se diferencian entre sí por sus características bioquímicas y naturaleza de los productos de reserva. No obstante han sido fundamentalmente sus pigmentos (distintos a la clorofila) (Mabeau y cols., 1990) los que han permitido clasificar a las macroalgas marinas en tres grupos: Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta que se corresponden respectivamente con algas rojas, marrones y verdes (Mohamed y cols., 2012).

Las algas marinas son ricas en fibras solubles, proteínas, minerales, vitaminas, antioxidantes, fitoquímicos y contienen bajas cantidades de grasa que le suponen un bajo contenido calórico. No obstante, un porcentaje significativo de sus ácidos grasos corresponde a AGP y en particular a AGP de la familia omega-3. Sin embargo, como toda la flora, sus contenidos en nutrientes se afectan por factores externos como la localización geográfica, medio ambiente, temporada y condiciones de recolección (Bocanegra y cols., 2009a; Mohamed y cols., 2012).

Como se ha comentado en el apartado 1.1., en el desarrollo de la aterosclerosis confluyen entre otros aspectos modificaciones del estatus antioxidante y del perfil lipoproteico a los que nos referiremos a continuación. Tópicos que se deben tener en cuenta para la mejor explicación de los efectos funcionales de los cárnicos enriquecidos con algas.

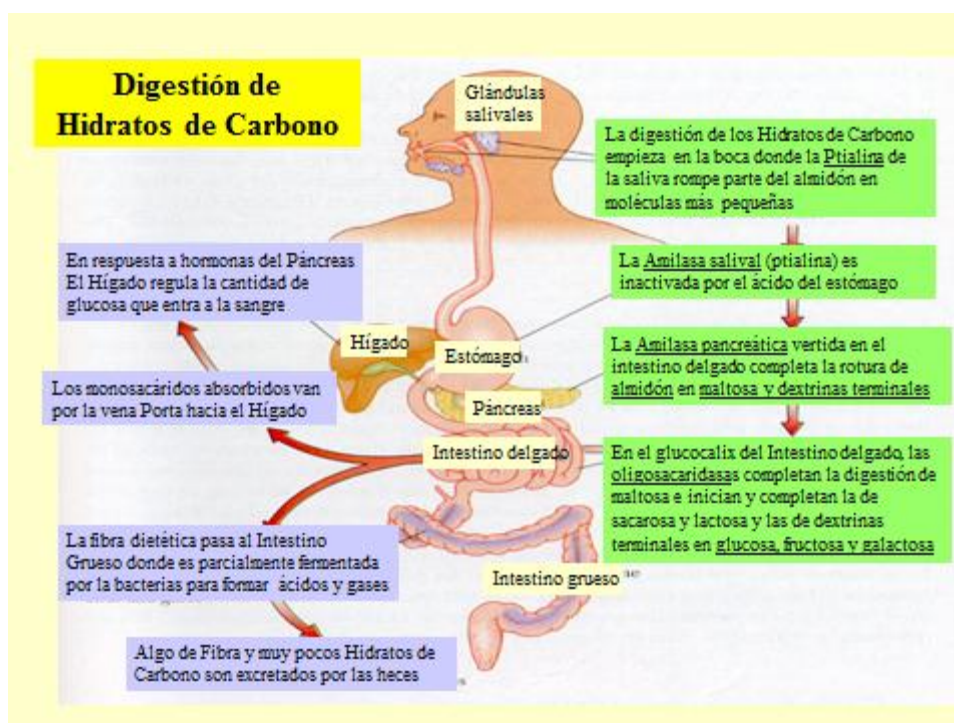
### **1.6. DIGESTION DE HIDRATOS DE CARBONO. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL SISTEMA MALTASA Y DE LA DIFUSIÓN DE GLUCOSA. REPERCUSIONES EN LA SALUD**

La digestión de alimentos es un proceso complejo donde el alimento es convertido en componentes más sencillos que puedan ser absorbidos por las células de la mucosa gastro-intestinal (Mataix y cols., 2001; Mahan y Escott-Stump, 2008; Gil, 2010). En este proceso intervienen multitud de reguladores endocrinos y nerviosos que controlan tanto los niveles de enzimas digestivos, como el pH, la motilidad del tracto digestivo y su protección a través de la producción de mucina y otras sustancias (Mataix, 2009).

Además este mecanismo induce la puesta en marcha de procesos en la mucosa gastrointestinal que inducen la expresión de multitud de receptores, transportadores y moléculas de muy diferente índole. No debemos tampoco olvidar que en el aparato digestivo existe una microflora anexa, de la que desconocemos muchos aspectos de su papel en la digestión, pero que contribuye a la integridad de la mucosa digestiva, particularmente del colon, creando una barrera inmunológica contra patógenos (Mahan y Escott-Stump, 2008), produciendo vitaminas de forma endógena, contribuyendo a la renovación de los colonocitos a través de la formación de compuestos volátiles mediante la fermentación de fibra dietética y compuestos asociados (Mataix, 2009).

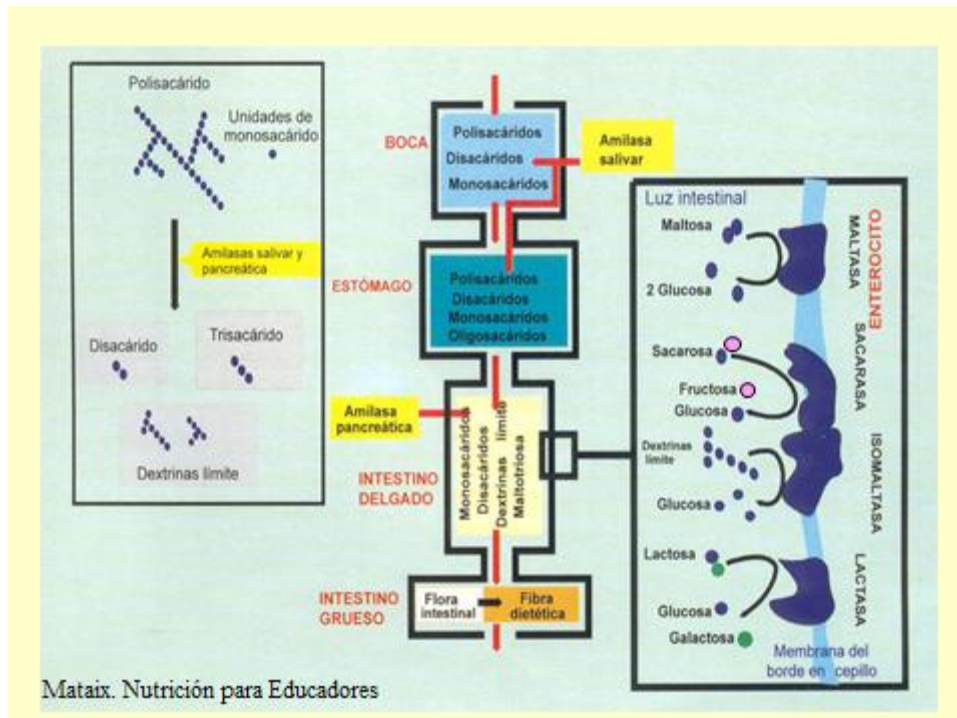
El proceso digestivo de los hidratos de carbono complejos se produce por la acción secuencial de amilasas y de oligosacaridasas (**Figura 2**) de tal forma que se va produciendo una degradación hidrolítica con formación de moléculas más pequeñas que finalmente son convertidas en monosacáridos objeto de absorción por la mucosa intestinal. La digestión de los hidratos de carbono (almidón, glucógeno, dextrinas) comienza en la boca por acción de la amilasa salival o ptialina que actúa como enzima hidrolítica a pH básico.

Esta actividad enzimática depende de muchos factores, pero entre otros del tiempo de permanencia en la boca, las características propias del individuo (tipo de saliva, tipo y cantidad de microflora bucal), eficacia masticatoria, etc. Cuando los hidratos de carbono acceden al estómago, la actuación de la ptialina se bloquea por el pH gástrico. Puede señalarse que del orden de un 10% de los hidratos de carbono se hidrolizan a componentes de peso molecular más reducido, si bien el grado de formación de monosacáridos (glucosa) es muy bajo por la incapacidad de la amilasa de romper uniones terminales formadas por dos glucosas. El proceso de degradación más importante acontece en el intestino por acción de la amilasa pancreática que degrada el almidón hasta maltosa (dos glucosas unidas por puentes  $\alpha$  1-4) maltotriosa (3 glucosas unidas por puentes  $\alpha$  1-4) y oligosacáridos (dextrinas terminales o dextrinas límite con 3 a 9 glucosas donde hay puentes  $\alpha$  1-6), no reconocibles por las amilasas.



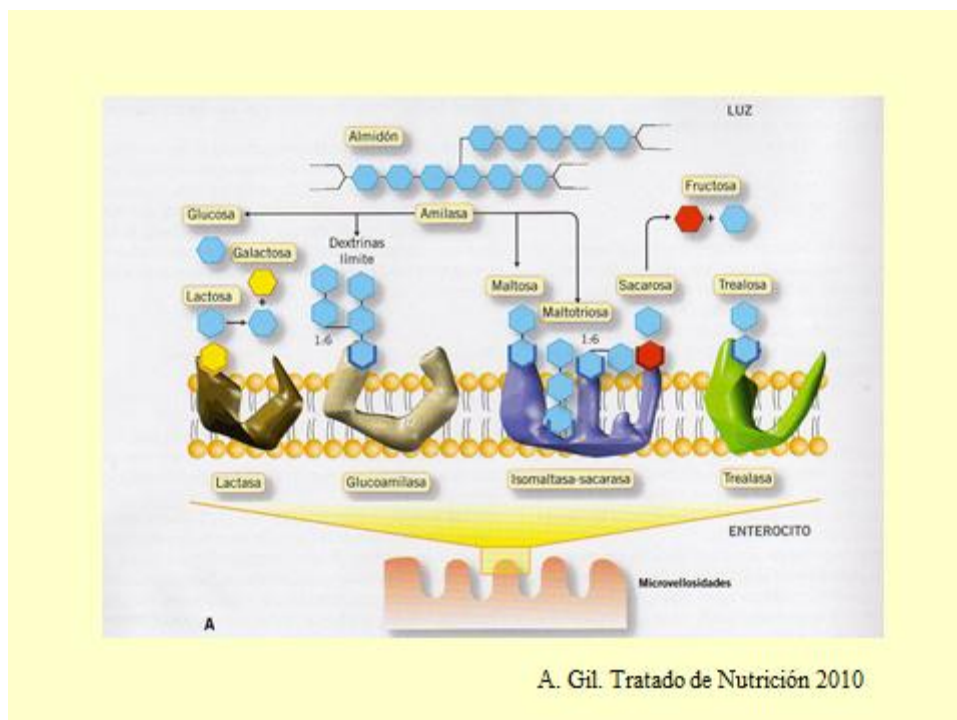
**Figura 2.** Esquema de los procesos centrales en la digestión de hidratos de carbono. Fuente: Sánchez-Muniz (2013). Clases de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Adaptado de Smolin y Crosvenor (2000).

Las amilasas tampoco hidrolizan a los disacáridos lactosa y sacarosa, los cuales deben ser atacados por otras enzimas para su conversión en monosacáridos. Por tanto, maltosa, maltotriosa, dextrinas límites, lactosa y sacarosa deben ser convertidos en monosacáridos susceptible de absorción por la acción de las oligosacaridasas de las células epiteliales de las microvellosidades que revisten la luz del intestino delgado (**Figura 3**). En términos didácticos podemos decir que la acción digestiva se completa por la acción de la maltasa que rompe maltosa y maltotriosa en glucosa, la lactasa que rompe la lactosa en galactosa más glucosa y la sacarasa-isomaltasa (un enzima con dos centros activos) que hidroliza la sacarosa en glucosa más fructosa y a las dextrinas terminales en moléculas de glucosa. También se ha señalado acción trealasa, un enzima que actúa rompiendo la trealosa (**Figura 4**). No obstante debemos comentar que existe evidencia científica de la actuación no específica de ellas sobre estos productos de la digestión (por ejemplo la maltasa tiene cierta acción sobre las dextrinas límites) (Mártínez de Victoria y cols., 2010).



**Figura 3.** Detalle de la digestión de hidratos de carbono. Fuente. Mataix Verdú ( 2005).

La acción de la maltasa es a su vez no simple y se ha señalado efecto enzimático plural, aunque su acción más importante es la glucoamilásica (Martínez de Victoria y cols., 2010) rompiendo maltosa en dos moléculas de glucosa.



**Figura 4.** Detalle de la digestión de oligosacáridos. Fuente: Martínez de Victoria y cols. (2010).

Dicha maltasa/glucoamilasa tiene marcadas propiedades hidrolíticas a pH entre 6 y 7,5. Necesita ión calcio para su actuación. A su vez está activada por la ingestión de alimentos y entre los inhibidores más importantes se encuentra la acarbosa.

Los monosacáridos, procedentes de la digestión de los hidratos de carbono y los aportados como tales por la dieta, son absorbidos principalmente a nivel del yeyuno, y a través de la vena porta transportados al hígado, órgano fundamental en el metabolismo de los hidratos de carbono y específicamente de la glucosa. El carácter lipofílico de la membrana del enterocito y el hidrofílico de los monosacáridos dificulta la entrada de estos últimos dentro de los enterocitos. Esto hace que la absorción de los monosacáridos esté mediada por moléculas transportadoras de la membrana enterocitaria. La glucosa y la galactosa por similitud estructural, comparten el mismo mecanismo de transporte. Son absorbidas de forma activa utilizando energía metabólica y un transportador de membrana que realiza un transporte simultáneo de sodio (co-transporte). El sodio es bombeado desde el enterocito a la sangre a través del borde serosal, creándose un gradiente electronegativo en la célula que implica que el transportador ceda al citosol el ión sodio, y por ende a la glucosa. La fructosa se absorbe por difusión facilitada a favor de gradiente de concentración y concurso de un transportador de membrana (Mataix, 2009; Martínez de Victoria y cols., 2010).

Estos aspectos de la digestión y absorción de hidratos de carbono tienen incidencia importante en la salud cardiovascular, ya que en los países desarrollados y entre ellos en España, se ha producido en las últimas décadas un incremento marcadísimo de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los jóvenes y adultos (Ascaso y cols., 2009; Boscha y cols., 2002) que hace más proclive a estas poblaciones a sufrir otras enfermedades degenerativas asociadas como enfermedades cardiovasculares (ECV), Diabetes mellitus (DM) tipo II, síndrome metabólico (Ascaso y cols., 2009; Boscha y cols., 2002). Por ello en la actualidad se están poniendo en marcha distintas estrategias para reducir el exceso de ingreso de energía y nutrientes energéticos que potencian el incremento de peso y, por ende, la prevalencia de enfermedades asociadas, en particular la DM tipo II.

La hiperglucemia postprandial parece un factor de riesgo clave en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM al inducir la glicosilación proteica no enzimática (Serrano y cols., 2009). Por ello el control de los niveles de la misma resulta crítico en el tratamiento de la DM, ya que reduce el riesgo de aparición de alteraciones micro y macrovasculares (Serrano y cols., 2009).

Dentro de las estrategias empleadas para reducir la glucosa postprandial se encuentran la inhibición de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasas, y la disminución de la absorción de hidratos de carbono a nivel de membrana intestinal después de la ingesta de alimentos. El resultado es una ralentización en la digestión de carbohidratos que conlleva a su vez una reducción de los picos postprandiales de glucosa (Cueva, 2007). Entre los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa destaca la acarbosa, fármaco ampliamente utilizado en la práctica médica actual (Kumar y Sinha, 2012).

### **1.7. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

En el mundo aeróbico, frente a la considerable toxicidad del oxígeno, los organismos vivos han puesto en marcha mecanismos adaptativos que se han organizado como sistemas de defensa frente a este gas (Cascales, 1999). Aunque una fracción de los radicales libres (RL) generados en el organismo son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes, con lo cual producirán un cierto nivel de daño, la mayor parte de los RL, al menos en muchas partes de la célula, son eliminados mediante antioxidantes. En consecuencia, las células desarrollan una serie de sistemas de defensa frente a su acción perniciosa.

Existen varias clasificaciones de las defensas antioxidantes, entre ellas destacaremos:

#### **a.- Defensas antioxidantes primarias y secundarias**

Las primarias previenen el fenómeno oxidativo impidiendo la formación del RL, o eliminando el RL cuando éste se forma. Aquí se incluirían la vitamina E, el ácido ascórbico,  $\beta$ -carotenos, ácido úrico, y algunas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) (Mataix y cols., 2001).

En cuanto a las secundarias, su función no residiría en ser protectoras o eliminadoras del agente antioxidante, sino que su papel sería el de eliminar los productos nocivos formados, impidiendo una acumulación indeseable. En este segundo grupo se incluyen enzimas de reparación del ADN (exonucleasas y endonucleasas), enzimas proteolíticas (proteasas y peptidasas), enzimas lipolíticas (fosfolipasa A<sub>2</sub>) y transferasas (Mataix y cols., 2001).

#### **b.- Defensas antioxidantes en función del mecanismo de acción**

Los sistemas antioxidantes en función de los mecanismos de acción se clasifican en antioxidantes de prevención, antioxidantes que eliminan RL (radical “scavenger”) y sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis *de novo* (Mataix y cols., 2001).

### c.- Sistemas antioxidantes según su naturaleza

Se clasifican en sistemas antioxidantes enzimáticos y sistemas antioxidantes no enzimáticos.

El descubrimiento en 1968 de la SOD, una enzima que actúa específicamente sobre RL, despertó el interés de los científicos por los sistemas antioxidantes. En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción de RL y su destrucción por los sistemas antioxidantes, sin embargo, este equilibrio puede alterarse, tanto de forma natural como artificial, si se aumenta la producción de RL, o se encuentran disminuidos los sistemas de defensa (Monaghan y cols., 2009).

### **1.7.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS**

Los mecanismos de destoxificación existentes en el organismo pueden actuar a nivel intracelular y extracelular. En cualquier caso, las principales sustancias sobre las que actúan, dichos mecanismos destoxificadores, son el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

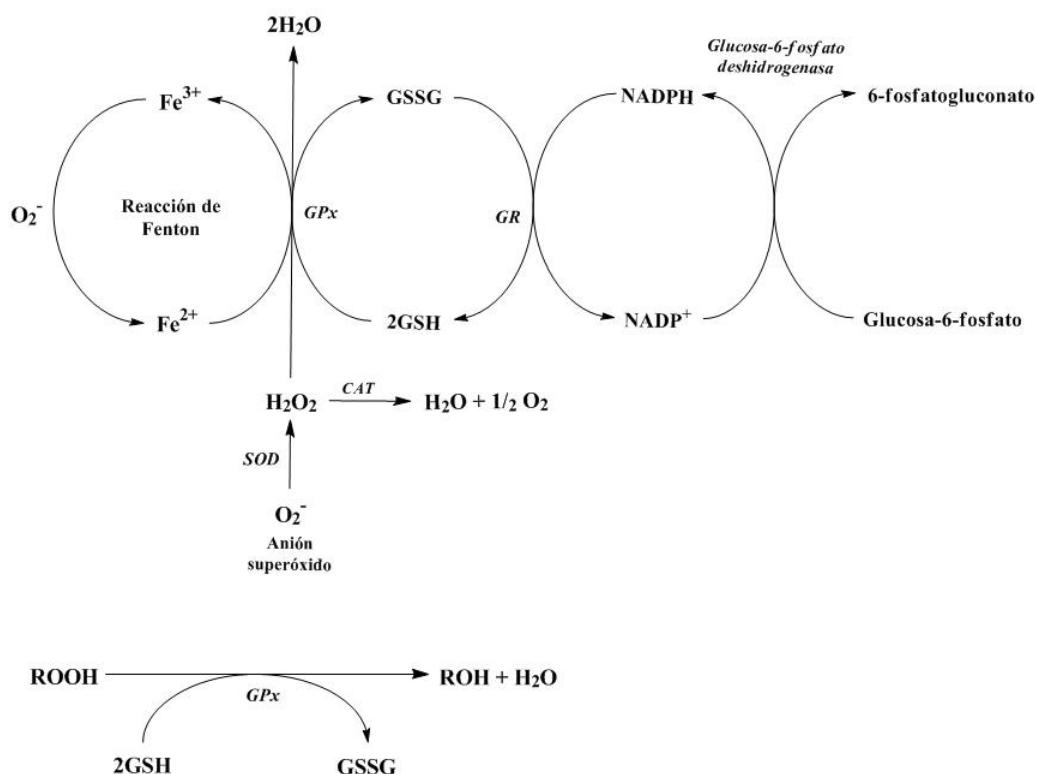
Por lo tanto, el modo de evitar la formación del radical hidroxilo e impedir la difusión de las especies reactivas de oxígeno a otros tejidos es la eliminación de esas dos especies reactivas por los enzimas destoxificantes disponibles. Algunas de estas enzimas son la SOD, la CAT; la GPx, la glutathion reductasa (GR). En la **Figura 5** se presenta un esquema integrador de los mecanismos antioxidantes enzimáticos más importantes.

#### **1.7.1.1. Superóxido dismutasa**

La SOD (EC 1.15.1.1) es una metaloproteína, descubierta por Fridovich, cuyo lugar de acción es principalmente el interior de las células; ya que, a nivel extracelular (en plasma por ejemplo), aparece en concentraciones despreciables. A nivel intracelular se distribuye de manera mayoritaria en mitocondrias y citosol.

Existen dos isoenzimas de la SOD: la Cu,Zn-SOD, conocida como “eritrocupreína” que está localizada principalmente en el citosol y es un dímero que contiene dos átomos de Cu y dos de Zn, alcanzando el peso molecular de 33 kDa. La otra isoenzima, es la Mn-SOD, y es una proteína tetramérica que presenta de dos a cuatro átomos de Mn, se encuentra en mitocondrias y tiene peso molecular de 85 kDa.





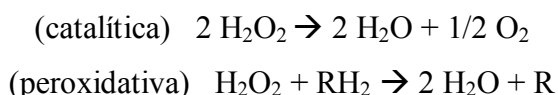
**Figura 5.** Esquema de integración de los mecanismos enzimáticos más importantes en la eliminación de radicales libres. CAT, catalasa; GSH, glutathion reducido; GSSG, glutathion oxidado; GPx, Glutathion peroxidada; GR, glutathion reductasa; NADP, nicotina-adenín-dinucleótido; SOD, superóxido dismutasa.

Estas isoenzimas se hallan presentes en la célula en concentración elevada, y son muy activas, lo que sugiere que los radicales superóxido que se están produciendo continuamente durante la reducción enzimática del oxígeno, por parte de diversos enzimas y sistemas enzimáticos, son rápidamente eliminados. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta  $O_2$  molecular, mientras que la otra se reduce a  $H_2O_2$  (Figura 5). Por tanto, más que eliminar formas activas del oxígeno, esta enzima transforma el superóxido  $H_2O_2$  (McCord y Fridovich, 1969).

### 1.7.1.2. Catalasa

Esta enzima (EC 1.11.1.6), abundante en el interior celular, se localiza en los peroxisomas (orgánulos oxidativos especializados) como ocurre en la rata o en el citosol como ocurre en otras especies animales. Es una hemoproteína tetramérica de peso molecular elevado (240kDa) en la que el átomo de hierro realiza el intercambio redox. La CAT degrada de forma inmediata el peróxido de hidrógeno formado anteriormente por la SOD o por las flavín-dependientes, impidiendo así, por medio de este mecanismo asociado, la formación del radical hidroxilo. La CAT es una enzima muy activa,

posiblemente porque se necesita eliminar muy rápidamente la alta producción de radical superóxido que se origina durante la reducción enzimática de oxígeno. Esta enzima interviene en dos tipos de reacciones, la “catalítica”, donde dos moléculas de peróxido de hidrógeno se descomponen en agua y oxígeno molecular, y la degradación peroxidativa del peróxido de hidrógeno que precisa de un agente reductor (Figura 5) (Mataix y cols., 2001):



### 1.7.1.3. Glutation peroxidasa

Las GPx (EC 1.11.1.9) son enzimas celulares que catalizan la descomposición de los hidroperóxidos (ROOH), reduciéndolos a formas estables como los hidróxidos (ROH), utilizando específicamente el glutatión (GSH) como agente reductor originando GSSG (Yu, 1994) mediante la reacción:



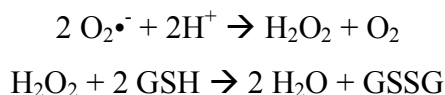
El GSH es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores. Se trata de una molécula que tiene un grupo sulfhidrilo (-SH) que la hace idónea para atenuar el efecto de los RL. Por ello, es empleado como un cofactor esencial en diversos sistemas enzimáticos. Un claro ejemplo lo constituye el sistema de la enzima GPx.

Dicha enzima contiene selenio, probablemente como parte de un centro activo. Es específica para su donante de hidrógeno, el GSH, no siendo específica para el hidroperóxido. Esta falta de especificidad de sustrato aumenta su capacidad de acción, actuando sobre moléculas como  $\text{H}_2\text{O}_2$  o los hidroperóxidos orgánicos. Por tanto, aunque la GPx comparte el sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  con la catalasa, puede reaccionar también con los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) (Mataix y cols., 2001) (Figura 5).

Existen dos formas básicas de la enzima: tetramérica dependiente de selenio (GPx-Se) y dimérica no dependiente de selenio (GPx-no Se). En la primera, el selenio es esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína. La otra forma no contiene selenio, tiene menor peso molecular, y sólo elimina ROOH (Ticc y Setlow, 1985).

En el estado estable se requiere la regeneración del GSH por la reducción del GSSG (Figura 5). La GSSG reductasa, dependiente de NADPH tiene una distribución subcelular similar a la de la GPx. La oxidación del NADPH acopla la acción de la GPx con los sustratos unidos a NADPH (Mataix y cols., 2001).

La mayor eficacia de la GPx con respecto a otras enzimas antioxidantes capaces también de eliminar el peróxido de hidrógeno, se debe a que están en los mismos compartimentos subcelulares que la SOD: citosol y mitocondrias, con lo cual el acoplamiento de las reacciones de formación y destrucción del peróxido de hidrógeno es mayor.



La enzima GPx no puede actuar en la fracción lipídica, por lo que sólo tras la liberación previa del ácido graso peroxidado desde la membrana al citosol por parte de las fosfolipasas eliminaría los ROOH lipídicos, reduciéndolos a sus formas estables (ROH). Flohé y Ursini (2008) han caracterizado, sin embargo, otra GPx-Se que funciona directamente en la fracción lipídica. Esta GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos (FL) se distribuye en muchos tejidos y requiere más selenio para mostrar toda su actividad (Weitzel y cols., 1990).

#### **1.7.1.4. Glutation reductasa**

La enzima GR (EC 1.6.4.2) es una flavoproteína presente en el citosol y las mitocondrias celulares que cataliza la reducción de una molécula de GSSG a dos de GSH a expensas de equivalentes de reducción en forma de NADPH. Así, la actividad de esta enzima permite mantener los niveles de GSH para la acción de la GPx. El glutatión tiene un importante papel como reductor de los procesos de óxido-reducción, actuando también en los procesos de detoxificación y en otras funciones celulares de gran importancia (Mataix y cols., 2001). Puesto que el *pool* de GSH celular es limitado y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula, esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento de la eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la vía de las GPx, así como para la reconstitución del GSH oxidado no enzimáticamente (Yu, 1994).



Las GR presentan FAD (flavin adenin dinucleotido) como coenzima. Debido a que la GR precisa, a su vez, de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, se considera también a las enzimas de la vía de las pentosas, glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa (productoras citosólicas de NADPH), como segunda línea de defensa antioxidante (Yu, 1994).

Por tanto, la acción beneficiosa de un elevado balance GSH/GSSG es necesaria para el mantenimiento de la salud, ya que promueve la detoxificación de  $H_2O_2$  y de otros agentes tóxicos exógenos.

### **1.7.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS**

Existen multitud de antioxidantes no enzimáticos, destacándose por su importancia el glutathione, las vitaminas E y C, los  $\beta$ -carotenos, la albúmina, nicotinamida,  $\alpha$ -carotenos, ácido úrico, taurina, ubiquinona, melatonina, quelantes de metales pesados, taninos, alcaloides del *Ginkgo biloba*, selenio, lactoferrina (por su acción limitante en la formación del  $OH\cdot$  al ligarse a dos iones  $Fe^{3+}$  por molécula, limitando por lo tanto la reacción de Fenton), etc. (Mataix y cols., 2001).

A continuación se comentan aquellos antioxidantes no enzimáticos a los que se les ha dado mayor relevancia en la bibliografía científica:

#### **1.7.2.1. Vitamina E**

En la naturaleza existen ocho compuestos con actividad vitamina E: el d- $\alpha$ , d- $\beta$ , d- $\gamma$ , y el d- $\delta$  tocoferol y los correspondientes tocotrienoles. El d- $\alpha$  tocoferol es el que muestra más actividad biológica y constituye un estándar de comparación.

La vitamina E es el antioxidante de la membrana celular más eficaz que se conoce, protegiendo a la misma del daño peroxidativo. Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor de los grupos hidroxilos de su anillo cromanol. Dicha vitamina, después de haber sido oxidada, y antes de descomponerse, puede ser reducida de nuevo a su forma original por el ácido ascórbico y el glutathione, entre otros compuestos (Mataix y cols., 2001).

Su solubilidad en la membrana le permite la accesibilidad directa a grupos peróxilos ( $ROO\cdot$ ) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales serían entonces degradados hasta alcoholes (estables) por la GPx. La importancia capital de esta reacción es que impide que los radicales  $ROO\cdot$  afecten a otras sustancias orgánicas; es decir, evita la reacción de propagación (multiplicativa), que es la principal causante de la peroxidación lipídica (Mataix y cols., 2001). Por tanto, la función más aceptada de la vitamina E, es su papel de “scavenger” de los RL, previniendo la lesión oxidativa de los AGP y de las proteínas de las membranas celulares ricas en grupos tioles, preservando así la integridad estructural funcional de los orgánulos subcelulares. Por

ello, la vitamina E es particularmente importante para evitar la degradación oxidativa en orgánulos, tejidos y dietas que contienen niveles relativamente elevados de AGP.

#### **1.7.2.2. Carotenoides**

Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas. Se han descrito casi 600 carotenoides diferentes. Sin embargo, sólo algunos de ellos aparecen en cantidades apreciables en los tejidos y plasma. Entre estos últimos se encuentran los  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos, la luteína, el licopeno, la zeaxantina y la criptoxantina.

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza con función pigmentaria, pero además, algunos de ellos, como es el caso de los  $\beta$ -carotenos, la luteína o la zeaxantina, presentan acción antioxidante, ya que actúan como agentes protectores frente a los efectos lesivos de la luz, del oxígeno y de los pigmentos fotosensibilizadores, o, como compuestos reactivos, lo que es especialmente importante frente a las especies químicas generadas en el interior celular con capacidad para inducir daño oxidativo. Además de su papel antioxidante, muchos carotenoides son precursores de la vitamina A, y protegen contra la sensibilización por la radiación luminosa.

#### **1.7.2.3. Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico actúa como un potente agente reductor. Así, reduce RL derivados del oxígeno, del nitrógeno y del sulfuro. Es un antioxidante soluble en agua que reacciona directamente con el radical superóxido. Sin embargo, en combinación con hierro o cobre puede acelerar la formación de dicho radical a través de la reacción de Fenton (Mataix y cols., 2001).

La vitamina C, también induce una protección significativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro*, presumiblemente porque mantiene en estado reducido y antioxidante a los tocoferoles de las LDL (Witzum, 1994).

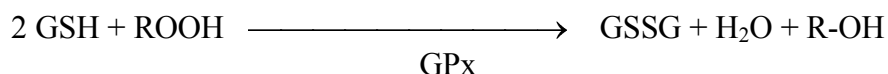
#### **1.7.2.4. Glutation**

El glutatión es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, cuya síntesis requiere la participación de 2 moléculas de ATP y  $Mg^{2+}$  como cofactor de las enzimas sintetas. El glutatión está ampliamente distribuido a nivel celular. De hecho, puede encontrarse en las células de los animales a concentraciones relativamente elevadas. El GSH es un reductor intracelular que tiene también un papel muy importante

en el catabolismo y en el transporte celular. Se encarga de proteger a las células contra los RL, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, destacando también su papel protector contra los efectos nocivos provocados por las radiaciones (Jones, 2008).

Aunque es un antioxidante muy extendido en el organismo (lo que demuestra su eficacia e importancia), la mayor parte del GSH es sintetizado en el hígado. Conviene tener en cuenta, que la síntesis de este tripéptido se realiza cuando no están presentes los sistemas normales de síntesis de proteínas (que comprenden mRNA, tRNA, ribosomas y los sistemas enzimáticos apropiados), razón por la cual, el glutathion puede formarse inclusive en el eritrocito maduro y desprovisto de núcleo (Grune y cols., 2000).

El glutathion puede considerarse como una especie de tampón redox que ayuda a mantener en su forma reducida a los grupos sulfhidrilo de las proteínas y al  $\text{Fe}^{2+}$  del grupo hemo. Su acción redox puede utilizarse también para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones anaeróbicas (Nelson y Cox, 2005) y mediante la siguiente reacción:



Desempeña múltiples funciones que pueden agruparse en una doble vertiente de propiedades biológicas, ya que actúa tanto como regulador y mantenedor de los procesos bioquímicos y fisiológicos como en la defensa celular contra agresiones externas, acoplado o no a reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas, protege de la oxidación a grupos  $-\text{SH}$  esenciales de las proteínas. También puede reaccionar con RL (como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  o  $-\text{OH}^{\bullet}$ ), debido a la presencia del grupo tiol reducido en su molécula.

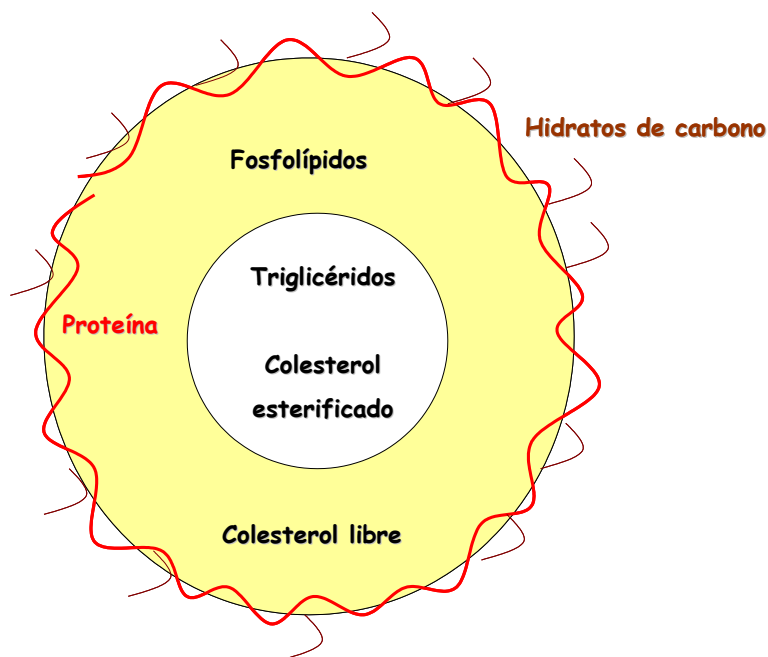
Entre sus múltiples funciones defensivas, destaca su actuación sobre el coenzima GSH-S-transferasa, a través de cuyo mecanismo enzimático se lleva a cabo la mayor parte de las biotransformaciones de xenobióticos, que tienen lugar en el hígado, previa eliminación por vía biliar o renal (Mataix y cols., 2001).

Es esencial para el normal funcionamiento de muchas células, especialmente en los mamíferos. De hecho, la disminución del GSH motiva un aumento de la sensibilidad celular a múltiples agresiones, produciendo, asimismo diversos efectos metabólicos, como por ejemplo, descenso del ritmo de la neoglucogénesis (Sáez y cols., 1985) y el aumento de la glucogenolisis (Viña y cols., 1983). También se ha comprobado el papel protector del glutathion. Como ejemplo se podría citar el estudio de Kamiyama y cols.

(1995), donde se observó que altos niveles de glutathion podían prevenir la hepatotoxicidad causada por exposición crónica al cadmio. El concepto de un umbral de glutathion como desintoxicante ya fue descrito por Jollow (1980), y esto también podría ser válido para otras funciones del glutathion.

### 1.8. METABOLISMO LIPOPROTEICO

Los lípidos para poder circular en la sangre, por su característica común de ser poco solubles en agua, deben unirse a proteínas (apolipoproteínas o apos) formando agregados que se conocen con el nombre de lipoproteínas. En la **Figura 6** se presenta un esquema de la estructura “ideal” de una lipoproteína. En su parte periférica se localizan aquellos componentes más polares los fosfolípidos (FL), el colesterol libre y las apos, mientras que en la parte central o “core” se sitúan los triglicéridos y el colesterol esterificado por diferentes ácidos grasos. Todas las lipoproteínas contienen hidratos de carbono, al parecer necesarios para su interacción con los receptores de lipoproteínas.



**Figura 6.** Estructura “ideal” de una lipoproteína. Referencia: Sánchez-Muniz, F.J. Curso de Doctorado “Nutrición y Enfermedades Cardiovasculares”. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2009.

Estas lipoproteínas se clasifican según su densidad de flotación en

- ❖ Quilomicrones (QM): <0,95 g/mL
- ❖ Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): 0,95-1,006 g/mL
- ❖ Lipoproteínas de baja densidad (LDL): 1,006-1,063 g/mL
- ❖ Lipoproteínas de alta densidad (HDL): 1,063-1,21 g/mL

❖ También se han definido otras lipoproteínas como las lipoproteínas (a) [Lp (a)] con densidad intermedia entre las LDL y HDL: 1,050-1,150 g/mL.

Estos intervalos de densidad corresponden a humanos, variando ligeramente en los animales. Así en las ratas, 1,057 g/mL sería el punto de corte de densidad entre las LDL y HDL (Terpstra, 1982; Terpstra y cols., 1985).

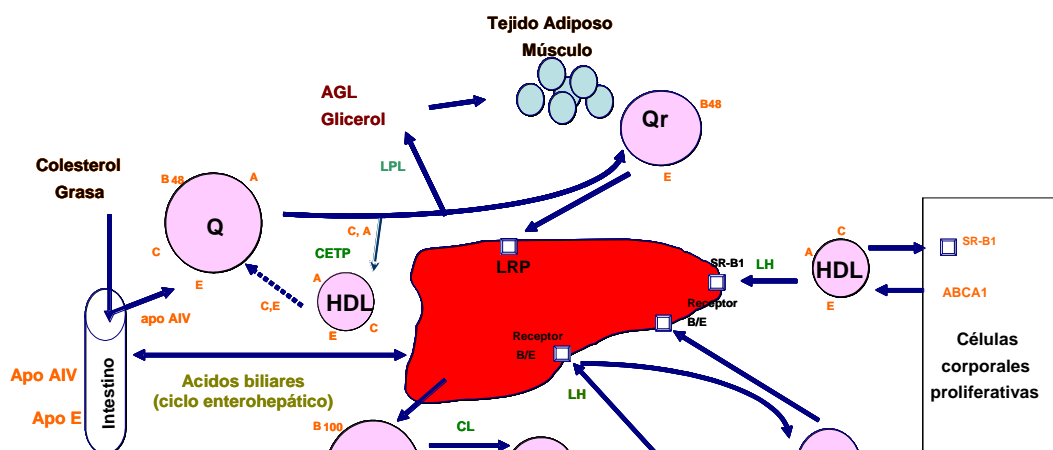
Los QM vehiculizan los lípidos de origen alimentario, siendo su función principal la de transportar ácidos grasos (AG) a los órganos y tejidos donde deben ser utilizados o almacenados. Se forman en el intestino a partir de los triglicéridos (TG), FL y colesterol libre y esterificado de la dieta. Después de su hidrólisis en el lumen intestinal, los AG, monoglicéridos, lisofosfolípidos y colesterol de la dieta son reutilizados en la mucosa intestinal para formar TG, colesterol esterificado y FL. Los TG y el colesterol junto con la apolipoproteína (apo) B-48, sintetizada por el intestino (Kane y cols., 1980), varias apo-A (I, II, IV, V) y lípidos polares (FL y colesterol) forman los QM. Estos QM pasan de linfa a sangre adquiriendo en este paso las apo C y apo E de las HDL (Green y Riley, 1981; Green y cols., 1979).

En la sangre, a su paso por el tejido adiposo y los músculos, la enzima lipoproteín-lipasa (LPL) activada por la apo C-II cataliza la hidrólisis de los TG de los QM (Fielding y Havel, 1977), produciendo AG libres, glicerol y residuos de QM (QM remanentes, QMr) (**Figura 7**). Estos QM, al perder parcialmente sus TG, quedan con un exceso de material de superficie, el cual puede originar partículas con características semejantes a HDL nacientes (HDL<sub>n</sub>) (Tall y cols., 1979) o ser transferido a HDL<sub>3</sub> con formación de HDL<sub>2</sub> (Patsch y cols., 1978). Los QMr pueden ser rápidamente captados de la circulación por receptores hepáticos y de otras células, que reconocen las apo E de la superficie de dichas partículas (Carrella y Cooper, 1979; Hui y cols., 1981). Los componentes lipídicos de los QMr pueden volver a sangre desde el hígado incorporándolos a otras lipoproteínas (Sherrill y cols., 1980).

Según Kane y cols. (1980) las VLDL son sintetizadas mayoritariamente en el hígado, a partir principalmente de apo B-100 (de síntesis hepática) y de AG (procedentes de la dieta o de la lipólisis). Los TG sintetizados en el hígado son almacenados con FL, colesterol y apo y secretados mayoritariamente como VLDL a la circulación (Janero y cols., 1984). Después de su secreción las VLDL nacientes adquieren diferentes apo. En este proceso de maduración, las HDL aportan apo C para que las VLDL sean degradables (Chajek y Eisenberg, 1978) y contribuyen a la esterificación del colesterol de las partículas VLDL (Nestel y cols., 1979). Este último



proceso ocurre por un intercambio de colesterol y ésteres de colesterol interviniendo la enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa (LCAT), el complejo de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (Ha y cols., 1981) y la proteína transportadora de FL (Rajaram y cols., 1980) (**Figuras 7 y 8**). En la rata, no existe CETP, por lo que el intercambio de lípidos entre las HDL y las VLDL es mucho menor (Barter y Lally, 1978).



**Figura 7.** Esquema general del metabolismo lipoproteico. Referencia: Sánchez-Muniz, F.J. Curso de Doctorado “Nutrición y Enfermedades Cardiovasculares”. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2009. Abreviaturas: ABCA1: Transportador “ATP binding cassette” tipo A1; CE: Colesterol esterificado; CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol; CL: Colesterol libre; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; HL: lipasa hepática; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT: Lecitín-colesterol-acil transferasa; LDL: Lipoproteína de baja densidad; LPL: Lipoproteín lipasa; LRP: Receptor de lipoproteínas para quilomicrones; QM: Quilomicrones, QMr: Quilomicron residuo o quilomicron remanente; SRB1: Receptor “scavenger” tipo B1; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

A continuación se citan algunos aspectos importantes del metabolismo de las VLDL de origen hepático:

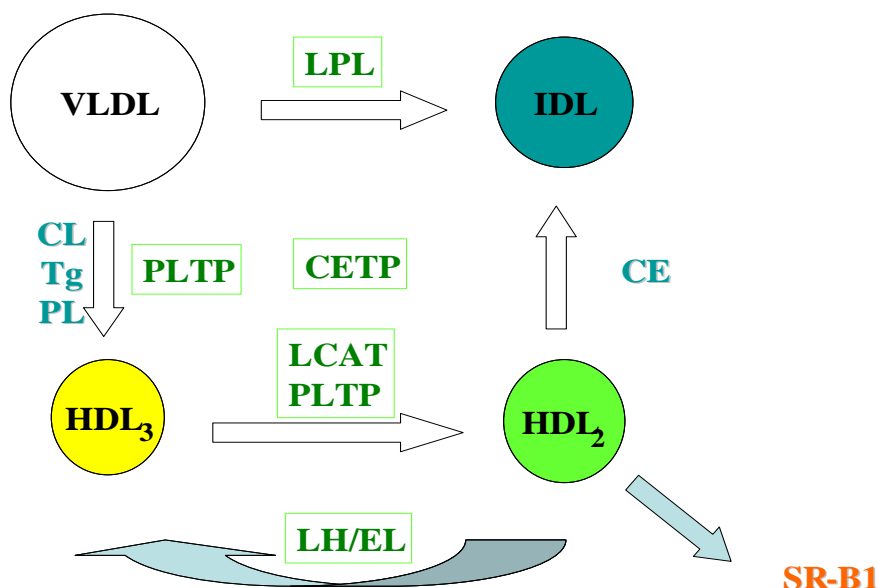
a) Hace falta la presencia de cofactores de la LCAT como las apos del grupo A (Soutar y cols., 1975); b) la adición de apo C-II regula la estimulación de la lipólisis de los TG (LaRosa y cols., 1970; Breckenridge y cols., 1978); c) la apo C-III produce la inhibición del aclaramiento hepático prematuro de VLDL (Shelburne y cols., 1980; Wang y cols., 1985). Así, la actividad de la LPL sobre las partículas VLDL parece

depender de la relación apo C-II/apo C-III de la misma (Carlson y Ballantyne, 1976); d) la apo E es reconocida por un receptor hepático que permite el aclaramiento hepático de VLDL mermaidas en TG y apo C (VLDL remanentes o IDL) (Sherrill y Dietschy, 1978); e) la IDL completa su transformación en LDL, perdiendo apo E y liberando los determinantes de unión de la apo B (Shelburne y cols., 1980), por lo que las LDL se podrían unir a los receptores que reconocen la apo B (Anderson y cols., 1976).

En plasma las VLDL pueden seguir dos vías metabólicas dependiendo de su tamaño. Así las VLDL de gran tamaño son atacadas por la LPL, dando residuos o remanentes de VLDL que posteriormente serían captadas por el hígado y catabolizadas. Estas VLDL no darían lugar a la formación de LDL. Sin embargo, las VLDL de menor tamaño que principalmente proceden del hígado conducen a la formación de LDL.

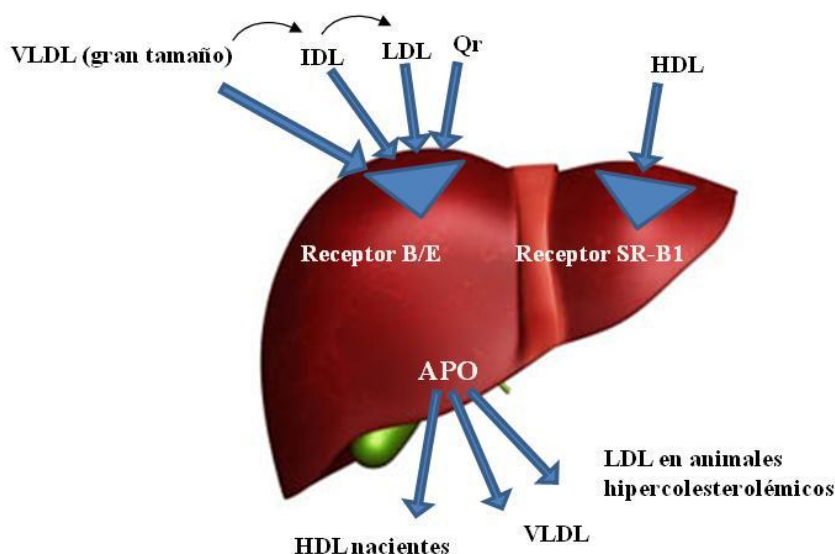
En el proceso de transformación de las VLDL en LDL (Gómez, 1988), interviene la LPL endotelial, con la apo C-II como cofactor, degradando los TG a AG libres. El exceso de material de superficie de las VLDL es transferido a las HDL (**Figura 8**). Al disminuir más rápidamente el contenido de apo C-II que el de apo C-III llega un momento en el que las VLDL residuales ya son IDL (Streja y cols., 1977). Las IDL contienen cantidades reducidas de TG y conservan la mayor parte de la apo E inicialmente presente en las VLDL. La vida media de las IDL es muy corta, siendo transformadas en LDL por degradación de sus TG y eliminación de la apo E. En la transformación de IDL en LDL parecen intervenir dos vías; por una parte una vía hepática receptor dependiente (apo E, apo B, E) (Brown y cols., 1983) con la intervención de la triglicérido-lipasa hepática (Rubinstein y cols., 1985), y por otra una vía extrahepática.

Uno de los aspectos que más diferencian el metabolismo lipoproteico en el hombre y en la rata es la formación de LDL. Así en humanos la mayor parte de las VLDL, sino toda, es convertida en LDL (Smith y cols., 1978), permaneciendo la apo B-100 en el complejo lipoproteico durante su transformación. En la rata, la apo B es aclarada de la circulación por las células hepáticas. La velocidad de desaparición es muy rápida y sólo el 10% de apo B aparece en IDL y posteriormente en LDL (**Figura 9**).



**Figura 8.** Interrelaciones entre lipoproteínas. Papel de la HDL en la conversión de VLDL en IDL. Referencia: Adaptado de Sánchez-Muniz, F.J. Curso de Doctorado “Nutrición y Enfermedades Cardiovasculares”. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2009. Abreviaturas: CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol; CE: Colesterol esterificado; CL: Colesterol libre; EL: Lipasa endotelial; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, Lecitín-colesterol-acil transferasa; HL: Lipasa hepática; LPL: Lipoproteína lipasa; FL: Fosfolípidos; PLTP: Proteína transferidora de fosfolípidos; SR-B1: Receptor “scavenger” tipo B1; Tg: triglicéridos; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Esto explicaría los bajos niveles de LDL que se encuentran en rata y que contribuyen a que este animal sea resistente a la hipercolesterolemia. No obstante, se ha señalado la síntesis directa de LDL por el hígado en animales alimentados con colesterol (Dolphin, 1981) y en pacientes hipercolesterolémicos (Kissebah y cols., 1984), situación no descrita en animales normocolesterolémicos (Guo y cols., 1982). También es evidente que las ratas hipercolesterolémicas presentan un perfil lipoproteico diferente a aquellas normocolesterolémicas, consistente fundamentalmente en VLDL enriquecidas en colesterol ( $\beta$ -VLDL) (Viejo y cols., 2003).

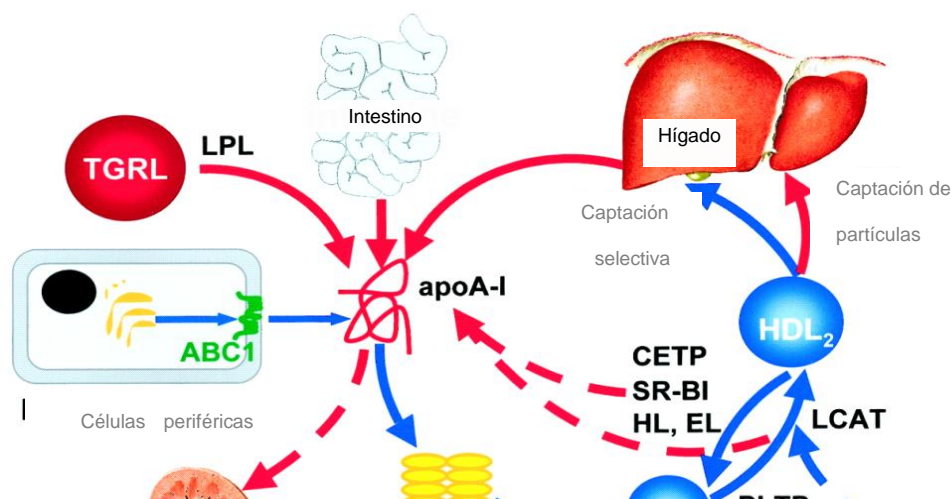


**Figura 9.** Resumen del metabolismo de las VLDL y LDL en la rata. Fuente Viejo (1989). Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Abreviaturas: HDL: Lipoproteínas de alta densidad; hepática; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: Lipoproteína de baja densidad; QR: Quilomicrón residuo o quilomicrón remanente; SRB1: Receptor “scavenger” tipo B1; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

En el hombre, las LDL son las mayores transportadoras de colesterol hacia los tejidos periféricos (Parks y Bullock, 1987), los cuales captan dichas lipoproteínas en virtud de mecanismos específicos dependientes del receptor apo B-100-apo E o mediante pinocitosis (Brown y Goldstein, 1984).

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas y más densas. No obstante, cuando se habla de HDL debe tenerse en cuenta que constituyen un grupo muy heterogéneo de partículas, habiéndose definido varias subpoblaciones de diferente composición lipídica y proteica, y por tanto, con densidad, tamaño y carga distintas (Asztalos y cols., 2005; Asztalos y cols., 2000; Watson y cols., 1997). Estas diferencias estructurales condicionan, a su vez, que cada subpoblación de HDL tenga funciones fisiológicas diferentes.

Con anterioridad hemos comentado que se sintetizan en hígado e intestino delgado (Alpers y cols., 1985; Sánchez de Medina, 2000), aunque en la última década hay claras evidencias de su formación en prácticamente todos los tejidos del cuerpo con participación del transportador ATP binding cassette (Lee y Parks, 2005). Las HDLn o inmaduras, pobres en ésteres de colesterol, presentan una estructura discoidal (una pequeña bicapa fosfolipídica central rodeada abundantemente de apo). Su apo principal es la apo A-I, aunque las HDL de origen hepático también suelen llevar apo A-II, apo C y apo E (**Figuras 7 y 10**).



**Figura 10.-** Esquema de la síntesis y metabolismo de las HDL. Tomado de Nus (2007). Abreviaturas: LPL: lipoproteína lipasa; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; LCAT: lecitina colesterol acil transferasa; HL: lipasa hepática; EL: lipasa endotelial; TGRL: lipoproteínas ricas en triglicéridos; SRB1: receptor “scavenger” B1; ABCA1: transportador ATP binding cassette A1; PLTP: proteína transferidora de FL.

La posterior transformación de estas partículas discoidales en esféricas, denominándose entonces HDL maduras, se realiza cuando estas HDL<sub>n</sub> alcanzan los depósitos titulares de colesterol y se produce la captación de colesterol y FL de las VLDL y los QM gracias a la acción de LPL, y su conversión en colesterol esterificado por acción de la LCAT (Alpers y cols., 1985). Este colesterol esterificado se sitúa en el centro de las HDL, formando las HDL más maduras (**Figura 10**). Es decir, en este proceso las HDL captarán colesterol de las membranas celulares y del interior de determinadas células, intercambiando lípidos y apo con otras lipoproteínas. Las HDL irán disminuyendo progresivamente en densidad y tomarán las formas que se han denominado como HDL<sub>n</sub>, HDL<sub>3</sub>, HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>1</sub> (Nichols, 1981).

En humanos se han diferenciado diferentes tipos de HDL, pero clínicamente se suele hablar de HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>, dos subpoblaciones de HDL diferentes. Así las HDL<sub>3</sub> son ricas en ésteres de colesterol. Son las HDL que además de apo A-I tienen una alta concentración de apo A-II. Cuando se lleva a cabo su separación por ultracentrifugación

aparecen en la zona de densidad  $1,125 < d < 1,21$  g/mL. Por su parte las HDL<sub>2</sub> son ricas en FL, TG y ésteres de colesterol. Cuando se lleva a cabo su separación por ultracentrifugación aparecen en la zona de densidades  $1,063 < d < 1,125$  g/mL.

Dicha heterogeneidad de las HDL se debe a los procesos extracelulares de remodelado que se esquematizan en la Figura 10 y en el que participan:

a) El transportador ATP binding cassette A1 (ABCA1) (Michael, 2002) que se localiza en la superficie celular y transfiere colesterol libre desde las células a las apo A-I pobres en lípidos formando las pre $\beta$ -HDL. Enseguida éstas adquieren FL y más colesterol libre formando las DNL, también conocida como pre $\beta$ <sub>2</sub>-HDL. El sistema ABCA1 ha sido definido recientemente como clave en la formación de HDL<sub>n</sub>.

b) La enzima LCAT que transfiere un grupo acilo desde la fosfatidilcolina al colesterol formando lisofosfatidil colina y ésteres de colesterol. Actúa sobre las HDL<sub>n</sub> transformándolas en HDL esféricas y maduras.

c) La Lipasa hepática que hidroliza los TG y los FL de todas las lipoproteínas, pero en especial de las HDL maduras.

d) La proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) que transfiere FL entre lipoproteínas; especialmente importante es su función transfiriendo FL desde los QM a las HDL.

Las HDL intervienen en el transporte reverso del colesterol (Miller y Miller, 1975; Van Tol, 1989), ya que transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción o degradación en forma de ácidos biliares, aunque también podría ser utilizado para su incorporación a nuevas lipoproteínas. Además, el aclaramiento de TG del plasma está relacionado con los niveles plasmáticos de HDL (Kekki, 1980) (Figura 4).

Schmitz y cols. (1985) demostraron que las HDL que contienen apo A-I son capaces de unirse a receptores de macrófagos y otros tipos de células. Tras su unión a receptores, las HDL serían internalizadas mediante un sistema que no interacciona con lisosomas, captando colesterol no esterificado del citoplasma celular y siendo resecretadas como una forma de HDL más rica en colesterol. La expresión celular de este tipo de receptores estaría regulada por su contenido en colesterol.

Tabas y Tall (1984) sugieren que la captación de colesterol por las HDL es un proceso en parte relacionado con las características fisicoquímicas de estas partículas y en parte con el receptor de apo A-I, recientemente identificado como receptor SR-B1 (Rigotti, 2004). Este proceso de captación parece quedar restringido a las formas más

densas de HDL (HDL<sub>n</sub>, HDL<sub>3</sub>), mientras que las formas menos densas interaccionan preferentemente con las otras lipoproteínas (Oram y cols., 1981).

Finalmente las HDL cargadas de colesterol (HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>1</sub>) serían eliminadas por el hígado en un proceso que es receptor dependiente (Figura 8). En resumen, el hígado es el mayor lugar de catabolismo de los ésteres de colesterol y de los FL de las HDL y otras lipoproteínas (Stein y cols., 1983). Es por lo tanto, el hígado, primordial en el metabolismo del colesterol. Por un lado, capta QMr, VLDL, IDL, LDL y HDL y, por otro, sintetiza colesterol y otros lípidos (Figuras 8 y 10).

Aunque controvertido, la rata ha sido el modelo animal más empleado en investigación junto con el conejo. De hecho, la rata se ha empleado para estudiar el efecto de la ingesta de diferentes grasas dietéticas, en particular en la prevención y tratamiento de la hipercolesterolemia, a pesar de que el metabolismo lipoproteico es diferente en ratas y en humanos. Según Sánchez-Muniz y Bastida (2008) la rata presenta normocolesterolemia cuando sus niveles de colesterol son <100 mg/dL (<2,58 mmol/L). También se considera marcador de normocolesterolemia cuando la relación colesterol/FL es <1. En este animal se diagnostica hipercolesterolemia moderada cuando el colesterol del plasma se encuentra entre 100 y 200 mg/dL (2,58 - 5,17 mmol/L) o cuando existe una relación colesterol/FL >1.; mientras que la hipercolesterolemia será severa con niveles de este esteroide en plasma ≥200 mg/dL (≥5,17 mmol/L). Las diferencias más importantes entre humanos y rata respecto al metabolismo lipoproteico se detallan a continuación:

- a) En la rata, la concentración de LDL es muy inferior a la de humanos ya que sólo un 10% de la apo B de las VLDL es transferida a las LDL (Bilheimer y cols., 1972), siendo el 90% restante aclarado del plasma principalmente por vía hepática (Fidge y Poulis, 1975) (Figura 9).
- b) En la rata, a diferencia del hombre, las HDL constituyen la fracción lipoproteica que más colesterol transporta (Cava, 1986). La fracción principal es la HDL<sub>2</sub>, y su contenido lipídico es similar al de humanos, pero no su contenido en apo, ya que tienen más apo A-IV y apo E y menos apo A-II.
- c) Las ratas carecen de CETP (Cava, 1986), por lo que las HDL no transfieren su contenido a otras lipoproteínas, sino sólo al hígado, por lo que estos animales constituyen un modelo muy útil para estudiar la tasa de transporte reverso del colesterol.

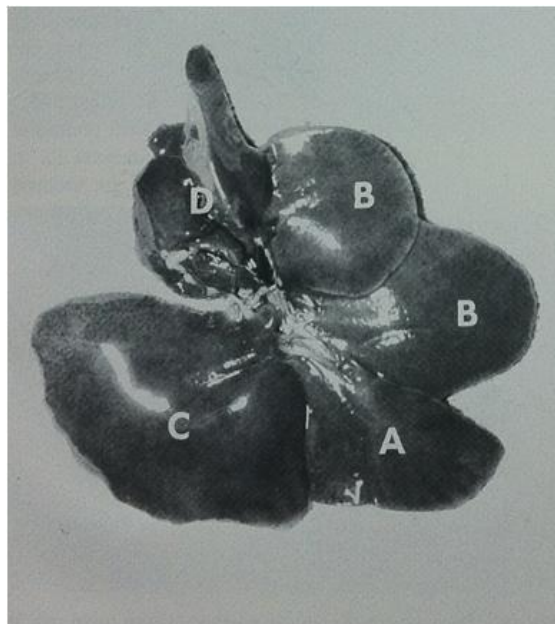
Nuestro equipo lleva años estudiando el efecto que produce la ingesta de dietas hipercolesterolemiantes en la rata. La inclusión de colesterol y ácido cólico o bilis en la dieta induce en la rata hipercolesterolemia grave (Sánchez-Muniz y cols., 1992; Sánchez-Muniz y cols., 1996), o moderada (Sánchez-Muniz y cols., 2006). Las ratas hipercolesterolémicas se caracterizan por presentar niveles elevados de  $\beta$ -VLDL (VLDL enriquecidas en colesterol similares a las IDL humanas) y bajos niveles de HDL (Sánchez-Muniz y cols., 2006). Esta disminución de HDL puede ser debida al aumento del transporte reverso del colesterol para normalizar la colesterolemia, posiblemente ligado a un incremento en la actividad de los receptores ABCA1 y SR-B1 (Bastida y cols., 2007). En estas mismas ratas, los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 parecen incrementar el transporte reverso del colesterol y disminuyen tanto las (VLDL+LDL) como las HDL (Bastida y cols., 2007) normalizando los niveles de colesterol, el perfil lipoproteico y la peroxidación plasmática medida como TBARS.

### **1.9. HÍGADO. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES DESTACABLES.**

El hígado es el órgano más voluminoso de la economía, en el hombre adulto pesa entre 1,4 y 1,8 kg mientras que en la rata adulta supone del orden de 8 a 9,5 g. Se encuentra en la cavidad abdominal, inmediatamente por debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio. En el hombre y en los animales el hígado está dividido en lóbulos. Así en humanos el ligamento falciforme divide al hígado en dos lóbulos principales, derecho e izquierdo. El lóbulo derecho tiene a su vez tres partes que se llaman lóbulo derecho propiamente dicho, lóbulo caudado (de forma cuadrangular en la superficie posterior) y lóbulo cuadrado o de Spiegel (una porción oblonga en la cara inferior) (Anthony, 1970). En la rata posee el lóbulo medio o cavidad quística, lóbulo lateral derecho, lóbulo izquierdo y el lóbulo caudado (American College of Laboratory Animal Medicine Series, 1979) (Figura 11).

Cada lóbulo está dividido en numerosos lobulillos por vasos sanguíneos de pequeño calibre y por cordones fibrosos que forman el armazón de sostén (cápsula de Glisson) para los mismos. La cápsula de Glisson es la prolongación de la cápsula de tejido conjuntivo grueso que rodea al hígado. Los lobulillos hepáticos, unidades anatómicas que forman esta víscera son cilindros hexagonales o pentagonales pequeños.



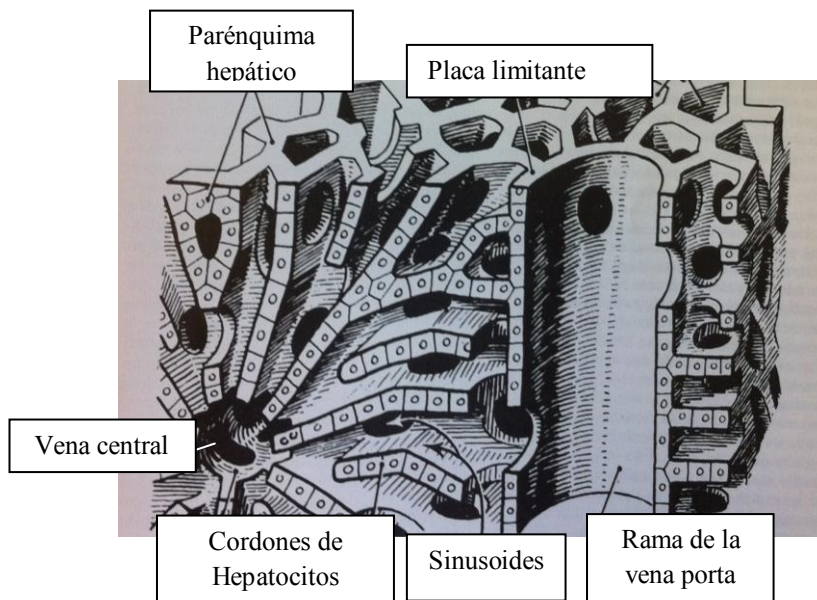


**Figura 11.** Fotografía del hígado de la rata señalando sus lóbulos. A, lóbulo medio o quístico; B, lóbulo lateral derecho; C, lóbulo izquierdo; D, lóbulo caudado. Tomado de American College of Laboratory Animal Medicine Series (1979).

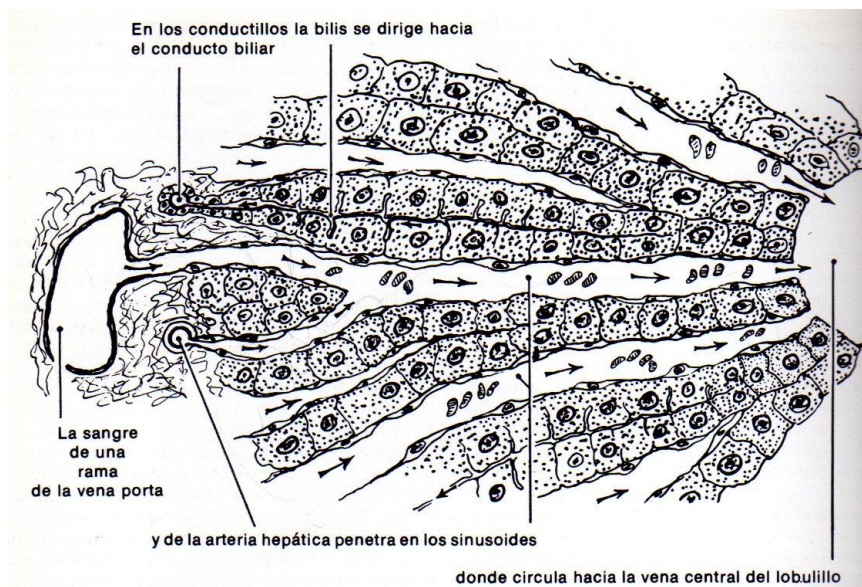
Por el centro de cada lobulillo hepático pasa una rama de pequeño calibre de la vena hepática; alrededor de la vena central o intralobulillar los hepatocitos están dispuestos en columnas que irradian hacia afuera (**Figuras 12 y 13**). Tres conjuntos de tubos diminutos: ramas de la arteria hepática, de la vena porta (venas intralobulillares) y del conducto hepático (vías biliares interlobulillares) se disponen alrededor de cada lobulillo. De estas zonas se extienden ramas irregulares (sinusoides) de las venas interlobulillares entre las columnas radiadas de hepatocitos para desembocar en la vena central. De esta manera análoga hay ramas de las vías biliares interlobulillares que se disponen entre cada dos hileras de células hepáticas (Han, 1977; Esteller Pérez y cols., 2010) (**Figuras 12 y 13**).

En el hombre los conductos biliares de pequeño calibre se unen dentro del hígado y forman dos conductos de diámetro mayor que salen por la cara inferior del órgano con el nombre de conducto hepático derecho e izquierdo, pero inmediatamente se unen para forman el conducto hepático que desemboca en el duodeno en una pequeña zona elevada conocida con el nombre de carúncula duodenal mayor, en cuyo interior está la ampolla de Vater que regula mediante un esfínter el vertimiento de bilis al duodeno. Parte de la bilis formada se almacena en el hombre y la mayoría de los animales en la vesícula biliar (Anthony, 1970). En la rata no existe vesícula biliar, por

lo que el hígado drena bilis al intestino directamente sin almacenamiento en dicha vesícula American College of Laboratory Animal Medicine Series, 1979).



**Figura 12.** Estructura tridimensional hepática mostrando los cordones hepáticos y los espacios porta (Ham, 1977).



**Figura 13.** Estructura hepática mostrando la estructura de los espacios porta y las relaciones entre sistema vascular y sistema biliar. Tomado de Ham (1977).

Desde el punto de vista histológico, la unidad estructural de los elementos parenquimatosos y vasculares de hígado es el acino hepático. Está dispuesto de tal

manera que le permite cumplir su función de guardián interpuesto entre la entrada de sustancias procedentes del trato digestivo y el resto del organismo. De esta forma está capacitado para captar sustratos, transformarlos, almacenarlos, distribuirlos o eliminarlos.

El hígado cuenta con un número muy abundante de células principales o hepatocitos. Es responsable de multitud de funciones endocrinas y metabólicas, gracias a que dispone de un polo vascular (sinusoides) y otro biliar (canalículos), los que les permite realizar multitud de funciones metabólicas y exocrinas. El hígado desempeña un papel esencial en el metabolismo de los nutrientes. Los excesos y defectos en la dieta, la presencia de ciertos xenobióticos (tóxicos, fármacos), o la ruta de administración de los nutrientes (parenteral) pueden originar lesiones hepáticas. Por tanto, los pacientes con trastornos hepatobiliares deben tener un seguimiento nutricional especial valorando la terapéutica específica.

Las principales funciones del hígado, y por tanto de los hepatocitos, están relacionadas con el

**a) Metabolismo de los hidratos de carbono**

- Glucogenogénesis
- Glucogenolisis
- Gluconeogénesis

**b) Metabolismo de las proteínas y aminoácidos**

- *Pool* de aminoácidos libres
- Síntesis proteica

**c) Metabolismo de los lípidos**

- Síntesis hepática de ácidos grasos
- Metabolismo hepático de colesterol
- Síntesis de apos
- Empaquetamiento de VLDL (y posiblemente de LDL)
- Captación de Qm, VLDL, IDL, LDL, Lp(a), HDL

**d) Síntesis de sales biliares**

**e) Destoxificación de sustancias endógenas (bilirrubina, colesterol) o exógenas (xenobióticos).**

Por tanto, su importancia nutricional es innegable, ya que proporciona una fuente continua de energía para el organismo. La capacidad hepática para almacenar y

modular la disponibilidad de nutrientes está regulada por diversos factores locales y por la demanda energética de los órganos periféricos y del cerebro. Está regulado por señales endocrinas pancreáticas, suprarrenales, tiroideas, y nerviosas. El hígado regula el flujo de nutrientes durante la fase postprandial para una metabolización rápida celular y almacenamiento en el propio hígado, en el tejido adiposo o en otras células. Durante la fase postabsortiva (interprandial, ayuno) el hígado contribuye, mediante la liberación o síntesis *de novo* de nutrientes a satisfacer las necesidades metabólicas del organismo. Además de los hepatocitos se encuentran otras células cuyas funciones se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Funciones más relevantes de las células hepáticas

<b>Tipo celular no parenquimatosos</b>	<b>Funciones</b>
Células endoteliales	Barrera funcional entre sangre y hepatocitos Captación mediada por receptores Pinocitosis Endocitosis (partículas <0,1 µm) Presentación de ectoenzimas (lipasas) Síntesis de moléculas efectoras (PEG <sub>2</sub> , citoquinas, etc.)
Células de Kupffer (macrófagos)	Fagocitosis (microorganismos, células tumorales, eritrocitos) Endocitosis (endotoxinas, complejos inmunitarios) Procesado de antígenos Citotoxicidad (superóxido, efectos antitumorales) Señalizadores comunicación intercelular (PI3K, TNF)
Células estelares (de Ito, lipocitos)	Almacenes de vitamina A Síntesis de proteínas de la matriz extracelular Regulación contráctil del flujo sanguíneo Expresión y secreción de factores de crecimiento
Células de Pit	Citolíticas naturales (natural killer)

Fuente: Esteller y cols. (2010).

El hígado puede alterar su funcionalidad por diversas causas debidas a infecciones, tóxicos, xenobióticos, isquemia, trastornos genéticos etc. Según Esteller y

*cols.* (2010) en términos generales el hígado presenta tres tipos de repuestas patológicas a las diferentes noxas etiológicas: a) la necrosis hepatocitaria, asociada a grados variables de inflamación, que usualmente no producen insuficiencia hepatocelular o lo hacen de forma leve y que se recupera completamente por regeneración; b) una respuesta similar a la anterior pero con insuficiencia hepatocelular aguda grave y fallo multiorgánico que en muchos casos conduce a la muerte del paciente, pero a veces presenta recuperación total; c) necrosis hepatocitaria moderada con carácter inflamatorio de carácter crónico que se acompaña tanto de fenómenos de regeneración como de fibrosis. Esta última conduce al cuadro de cirrosis. La obstrucción del flujo biliar, denominada colestasis, es la manifestación habitual de las enfermedades de las vías biliares. Cuando dicha obstrucción afecta al árbol biliar extrahepático, su etiología es litiásica o tumoral. La colestasis intrahepática que afecta a ramas menores del árbol biliar, puede tener consecuencias fisiopatológicas graves.

La inclusión en las dietas experimentales de colesterol y ácido cólico para aumentar la absorción del esteroide es una pauta experimental muy frecuente que conduce a la elevación del colesterol plasmático transportado fundamentalmente por VLDL enriquecidas en colesterol ( $\beta$ -VLDL, similares a las IDL humanas). Aunque no se conocen bien los mecanismos íntimos este proceso bloquea parcialmente la excreción de bilis y tiende a inducir hipertrofia hepática con acúmulo de grasa (esteatosis) caracterizado por elevación marcada tanto de colesterol esterificado, principalmente en forma de colesterol oleato, pero también de triglicéridos (Viejo y *cols.*, 2003; Sánchez-Muniz y *cols.*, 2004). En situaciones crónicas de consumo de colesterol y ácido cólico, la rata desarrolla hipercolesterolemia severa, presentando el hígado un aspecto blanquecino, siendo totalmente friable. En esta situación es común observar inflamación lobular o portal con lesión celular o fibrosis y presencia de infiltrados de células mononucleares. En muchos casos se observan hepatocitos con vacuolizaciones grasas de distinta forma y tamaño y número (Bocanegra y *cols.*, 2008, 2009a). Es muy probable que este acúmulo de lípidos conduzca a estrés oxidativo, lo que provoca peroxidación de las lipoproteínas de membrana del hepatocito produciendo citoquinas y ligando Fas (Esteller y *cols.*, 2010). No hay que olvidar que el colesterol también es susceptible de ser oxidado formando oxisteroles, que iniciarían un proceso inflamatorio y degenerativo. En muchos casos este hígado graso se presenta habitualmente en pacientes o animales de experimentación con cierto grado de obesidad y mayor elevación de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) ó glutamato-piruvato

transaminasa (GPT), que se localiza fundamentalmente en el citosol del hepatocito, por lo que se la denomina (unilocular), mientras que la enzima aspartato aminotransferasa (AST) ó Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) está localizada sobre todo en la mitocondria y en el citosol, por lo que se la llama enzima bilocular. Esta última está presente, además del hígado, en otros órganos y células como son, en orden de abundancia, miocardio, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, leucocitos y eritrocitos.

### **1.10. PAPEL DE LA DIETA EN LA SALUD CARDIOVASCULAR**

La ECV sigue siendo la causa más frecuente de morbi-mortalidad en los países desarrollados. Es considerada una enfermedad inflamatoria asociada a la presencia de algunos factores de riesgo como hipercolesterolemia e hipertensión. El desarrollo de la ECV depende de la cantidad de lipoproteínas modificadas (p.e. oxidadas) presente a nivel del espacio subendotelial arterial (Sánchez-Muniz, 2012). Se considera que la aterosclerosis es una reacción inflamatoria crónica de las paredes vasculares en respuesta a la dislipidemia y el estrés endotelial que implica reclutamiento de los leucocitos inflamatorios y la activación de las células residentes vasculares (Libby, 2002). La dieta se considera piedra angular en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, ya que no sólo puede reducir el nivel y la oxidación de las lipoproteínas aterogénicas, la presión arterial, sino el impacto de algunos factores relevantes (p.e. trombogénesis, niveles de homocisteína) (Sánchez-Muniz, 2012).

Para no hacer muy extensa la introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral se presentan en las **Tablas 3 y 4** un resumen de las características nutricionales claves y del papel de los nutrientes y sustancias bioactivas sobre diferentes aspectos relacionados con la aterosclerosis y otras ECV, como metabolismo lipoproteico, trombogénesis, agregación plaquetaria, estatus antioxidante.

La **Tabla 3** resume los aspectos centrales de la dieta junto con el ejercicio, que definen en un sentido hipocrático -forma de vida- el concepto de dieta, que deben ser considerados en la profilaxis y tratamiento de las CVD (Ye, 2011; Badimón y cols., 2010; Rubiés-Prat, 2000; Sánchez-Muniz, 2012). El consumo adecuado de fruta y vegetales, característico de la dieta Mediterránea (Sánchez-Muniz, 2007; Krauss y cols., 2000), hace posible alcanzar los cuatro objetivos enumerados en la Tabla 3 (dieta saludable, peso corporal correcto, perfil lipoproteico aceptable, y presión arterial adecuada).

**La Tabla 4** resume los efectos de los nutrientes y sustancias bioactivas sobre diferentes factores de riesgo de ECV. Se señala de forma gráfica y semicuantitativa aquellos donde existe clara evidencia científica, pero también aquellos donde los efectos son menos evidentes o sólo probables.

Dado el contenido de esta Tesis Doctoral se expone en los tres siguientes apartados los efectos del consumo de algas sobre diferentes marcadores de riesgo de ECV, basándonos numerosos trabajos y en lo resumido en la Tabla 4 y que atañe a tres aspectos fundamentales: a) Efectos sobre el los niveles de colesterol plasmático y niveles de lipoproteínas y efectos antitrombóticos; b) Efectos sobre la presión arterial sistólica y diastólica; y c) Efectos antioxidantes (**Tablas 5 y 6**).

**Tabla 3.** Aspectos centrales a considerar para reducir o mantener bajo el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Perfil de consumo saludable	Peso corporal apropiado	Perfil correcto de lipoproteínas	Presión arterial adecuada
Consumir dieta mediterránea variada.	Adaptación del peso corporal e IMC <sup>(1)</sup> .	Adaptar de forma saludable el colesterol	Adaptar de forma saludable los niveles de
Incluir variedad de frutas y hortalizas	Balance energético/consumo.	plasmático total, LDL-colesterol y	presión arterial sistólica y diastólica por
(5 veces/día), cereales (4-6 veces/día),	Ajuste el peso a IMC de 20-25 kg/m <sup>2</sup> <sup>(1)</sup> .	triglicéridos a niveles por debajo de 200	debajo de 130 y 85 mmHg,
legumbres (2-4 veces/semana).	Para bajar de peso, cuando sea necesario,	mg/dL, 130 mg/dL, 110 mg/dL,	respectivamente <sup>(3)</sup> .
Consumir productos lácteos bajos en	seguir una dieta hipocalórica,	respectivamente <sup>(2)</sup> .	Mantener el peso corporal adecuado.
grasa, pollo, pescado y carne magra.	preferiblemente dietas hipocalóricas	Limitar los alimentos ricos en grasas	Mantener una dieta variada y rica en
Controlar el aceite culinario.	equilibradas (tipo mediterráneo).	saturadas y colesterol.	verduras, frutas y alimentos con poca grasa
Comer 4-5 veces/día.	Evitar largos períodos de ayuno.	Consumir grasas insaturadas	láctea.
Evitar largos períodos de ayuno.	Comer alimentos magros.	(preferiblemente monoinsaturadas y evitar	Consumir pescado azul (2 veces/semana).
Hacer ejercicio (al menos 30 min/día).	Controlar el aceite culinario.	el exceso de poliinsaturadas) de verduras,	Disminuir el consumo de sal y alcohol.
	Hacer ejercicio (al menos 30 min/día).	pescado, legumbres, frutos secos y	Controlar el aceite culinario.
		similares.	Hacer ejercicio (al menos 30 min/día).
		Mantener el peso corporal adecuado.	
		Controlar el aceite culinario.	
		Hacer ejercicio (al menos 30 min/día).	

Fuente: Sánchez-Muniz (2012). Para niños y adolescentes <sup>(1)</sup> usar tablas percentiladas nacionales en función del sexo y la edad (Fundación Faustino Orbegoza Eizaguirre); <sup>(2)</sup> Mantener los niveles de colesterol, LDL-colesterol, y triglicéridos <175mg/dl, <110 mg/dl, and <100 mg/dl, respectivamente (American Academy of Pediatrics, 1998); <sup>(3)</sup> tablas percentiladas nacionales en función del sexo y la edad (Ecija y cols., 2001). IMC, Índice de masa corporal.



**Tabla 4.** Efecto de la energía, macronutrientes y otras sustancias sobre diferentes factores de riesgo cardiovascular.

	TC	LDLc	HDLc	TG	Presión arterial	Agregación	Disfunción Endotelial	Oxidación	Otros
Energía	↑↑		↑	↓			↓		↑Peso corporal
Grasa	↑↑	↑?	↑		↑?		↓		↑Factor VII
Ácidos grasos saturados (C12-C16)	↑↑↑	↑↑↑	↑		↑	↑	↑	↓↓	↑Resistencia insulina
Ácidos grasos monoinsaturados	↓↓	↓↓	↑		↓		↓	↓?	↓Fibrinólisis; ↓PAI
Ácidos grasos poliinsaturados n-6	↓↓↓	↓↓↓	↓↓		↓*	↓*	↓	↑↑	↑
Ácidos grasos poliinsaturados n-3	↓?		↑	↓↓	↓↓	↓	↓	↓?	
Ácidos grasos <i>Trans</i>	↑	↑	↓	↑	↑?	↑?			↑Lp(a); ↑ Resistencia insulina
Colesterol	↑	↑	↑ <sup>w</sup>						
Alcohol*	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓↓	Varios efectos
Carbohidratos digeribles			↓	↑↑**	↓	↓	↓	↓↓	** Resistencia insulina
Protein Vegetal/Pescado	↓		↑	↓			↓		↑ (NO)
Proteína animal	↑	↑					↓		
Fibra	↓	↓			↓				
Fitosteroles	↓↓	↓↓					↓	↓?	↓Antioxidantes
Folato/vitamin B <sub>12</sub> /Vitamin B <sub>6</sub>						↓?	↓		↑Homocisteína
Vitamina E	↓?					↓	↓	↓	
Ca	↓				↓				
Cociente Zn/Cu	↑	↑							
Polifenoles*	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓↓	La mayoría <i>in vitro</i>
Café	↑↑***	↑↑***	↓***	↑↑***	↓?	↓?		↓↓	

Fuente: Sánchez-Muniz y cols. (2013). El número de flechas sugieren la magnitud del cambio (Opinión informativa de los autores). \*Alto consumo; <sup>w</sup>Efectos en mujeres; \*\*Fructosa; \*\*\*Cafestol y Kawheol (diterpenos del café); ↓? o ↑?, Evidencia científica limitada; TC, colesterol total; LDLc colesterol transportado por LDL; HDLc, colesterol transportado por HDL; TG, triglicéridos; PAI, factor inhibidor del activador del plasminógeno; Lp(a), lipoproteína (a).

**Tabla 5.** Fuente, características y bioactividad de los componentes de algas y sus efectos en el metabolismo lipídico, trombosis y coagulación.

Características		Fuente y contenido	Bioactividad	Referencias
Alga entera		7% como suplemento dietético Nori y Konbu <sup>1</sup>	Nori ↓ lipemia postprandial, ↓ infiltración grasa hepática en rats hipercolesterolémicas. Konbu incapaz de disminuir el colesterol plasmático <sup>1</sup>	<sup>1</sup> Bocanegra y cols. (2009a; 2009b)
Algas enteras o extracto lipídico	Ácidos grasos omega-3	Aceite obtenido de algas enriquecidos en DHA <sup>2</sup>	↓colesterol; otras actividades de DHA <sup>2</sup>	<sup>2</sup> Werman y cols. (2003)
Polisacáridos totales y alginatos	Polisacáridos totales	<i>Sargassum horneri</i> <sup>3</sup> Diferentes algas rojas y pardas <sup>4</sup>	Potente anticoagulante <sup>3</sup> ↓LDL-colesterol en ratas <sup>4</sup>	<sup>3</sup> Athukorala y cols. (2007) <sup>4</sup> Amano y cols. (2005)
	(Figuras 12 y 13 ácido alginico Polímero de dos unidades diferentes de ácidos urónicos (ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico) <sup>5</sup>	<i>Saccharina Latissima</i> : 17-33%; 18% <i>Laminaria japonica</i> <sup>6</sup> <i>Hijikia fusiformis</i> <sup>6</sup> <i>Fucus vesiculosus</i> <sup>7</sup> <i>Laminaria ochroleuca</i> <sup>7</sup> <i>Saccorhiza polyschides</i> <sup>7</sup> <i>Ascophyllum nodosum</i> <sup>9</sup>	Hipocolesterolemia y hipolipemia (↓absorción intestinal de colesterol) <sup>6,8</sup> ↓ colesterol total, colesterol libre, triglicéridos y fosfolípidos en el hígado <sup>9</sup>	<sup>5</sup> Arasaki y Arasaki (1983) <sup>6</sup> Kiryama y cols. (1969) <sup>7</sup> Lamela y cols. (1989) <sup>8</sup> Tsuchiya y cols. (1969) <sup>9</sup> Nishide y Uchida (2003)
Polisacáridos/fucoidano	Carragenina Polisacáridos sulfatados <sup>10</sup> Fucoidano como fucoidanos típicos (componentes principales) a fucanos heteropolisacáridos con bajo contenido de sulfato (elementos menores). Fucoidano contiene principalmente L-fucosa, sulfato, y ácido no urónicos.	<i>Chondrus crispus</i> 47%, 50%, 58-71% <sup>10</sup> <i>Ecklonia kurome</i> <sup>11</sup> <i>Laminaria sp</i> <sup>12</sup> <i>Fucus sp.</i> <sup>11</sup> <i>Ascophyllum nodosum</i> <sup>13</sup> <i>Undaria pinnatifida</i> <sup>14</sup>	↓colesterol y lípidos en sangre <sup>10</sup> Actividad anticoagulante y antitrombótica <sup>11,12,13</sup> Antiarteriosclerótica <sup>14</sup>	<sup>10</sup> Panlasigui y cols. (2003) <sup>11</sup> Nishino y cols. (1994) <sup>12</sup> Mayer y Hamann (2004) <sup>13</sup> Chevolot y cols. (1999) <sup>14</sup> Murata y Nakazoe (2001)
Laminaranos/Laminarina	Polisacárido ramificado (soluble) y no ramificado (insoluble): beta 1-3, beta 1-6 glicano, 84-94% de azúcar y 6-9% de ácido urónico. Contiene manitol. Sólo se encuentran en las algas pardas	<i>Saccharina latissima</i> : 0-33%, 16% <i>Laminaria digitata</i> : 14%, 0-18% <sup>15,18</sup> <i>Laminaria Hyperborea</i> <sup>18</sup> <i>Fucus vesiculosus</i> : 84% de azúcares totales <i>Fucus spiralis</i> <sup>18</sup>	Hipocolesterolemia y hipolipemia (↓absorción intestinal de colesterol) <sup>15</sup> ↓niveles de colesterol en suero, ↓lípidos séricos <sup>16</sup> ↓ colesterol total, colesterol libre, triglicéridos y fosfolípidos en hígado <sup>17</sup> Anticoagulante (forma de sulfato-éster) <sup>18</sup>	<sup>15</sup> Kiryama y cols. (1969) <sup>16</sup> Besterman (1970) <sup>17</sup> Ren (1994a) <sup>18</sup> Shanmugam y Mody (2000)

Porfirano	Polímeros de ácido sacárido conteniendo grupos sulfato, beta-1,3- xilano	<i>Porphyra sp.</i> <sup>19</sup>	Anticoagulante <sup>19</sup> Hipocolesterolemiante <sup>19</sup>	<sup>19</sup> Noda (1993)
Proteína	Lecitina	<i>Hypnea japonica</i> <sup>20</sup>	↓ aggregation plaquetaria <sup>20</sup>	<sup>20</sup> Matsubara y cols. (1996)
Aminoácidos	Taurina <sup>21,22</sup> Cociente Lisina/Arginina <sup>22</sup>	Diferentes algas	↓colesterol en suero e hígado de ratas <sup>21,22</sup> Hipocolesterolemiante <sup>22</sup>	<sup>21</sup> Lourenço y Camilo (2002) <sup>21,22</sup> Bocanegra y cols. (2009) indirect results
Minerales	Cociente Zn/Cu	Diferentes algas	Cociente bajo, ↓colesterol <sup>23</sup>	<sup>23</sup> Bocanegra y cols. (2008)
	Cr	Diferentes algas	Alto contenido de Cr, ↓colesterolemia <sup>24</sup>	<sup>24</sup> Weginward y cols. (2002)
Vitaminas	Vitamina B <sub>12</sub>	Diferentes algas	Baja disponibilidad de B <sub>12</sub> <sup>25</sup> ↓ homocisteína en plasma <sup>26</sup>	<sup>25</sup> Kanazawa y Herbert (1983) <sup>26</sup> Broekmans y cols. (2000)
Polifenoles	Florotaninos	<i>Sargassum thunbergii</i> <sup>27</sup> <i>Ecklonia stolonifera</i> <sup>28</sup>	↓colesterol (↑ receptorLDL) <sup>27</sup> Bloqueo de la inducción de hiperlipemia <sup>28</sup>	<sup>27</sup> Wei y cols. (2011) <sup>28</sup> Yoon y cols. (2008)
	Ficobiliproteínas	Diferentes algas	Antiinflamatorio, hipocolesterolemiante, protector hepático, tratamiento de aterosclerosis, reducción de los lípidos en suero y actividad inhibidora de la lipasa	Sekar y Chandamohan (2008)

Fuente: Sánchez-Muniz y cols. (2013). Los datos en diferentes columnas que llevan los mismos superíndices pertenecen al mismo experimento

**Tabla 6.** Bioactividad, fuente y características nutricionales de las algas sobre la presión arterial y propiedades antioxidantes

Características		Fuente y contenido	Bioactividad	Referencias
Alga entera		7% como suplemento dietético de Nori, Konbu <sup>1</sup> 2% Kelpo <sup>3</sup>	Nori ↑ Arilesterasa postprandial <sup>1</sup> ↓ sistema Glutation <sup>1</sup> ↑ GSH-Px en ratas alimentadas con colesterol <sup>2</sup> ↓ GSH-Px en ratas <sup>3</sup> ↓ GSH-Px en ratones viejos <sup>4</sup> ↓ presión arterial y frecuencia cardiaca	<sup>1</sup> Bocanegra y cols. (2009a; 2009b) <sup>2</sup> Mahfouz y Kummerow (2000) <sup>3</sup> Maruyama y cols. (1991) Ryan y cols. (2009)
Alga	Aceite enriquecido con DHA	1-2 g alga-DHA ( <i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochycticum</i> sp.)		
Fibra y Polisacáridos	Funorano, fucoidano, alginato y porfirano	5% <i>Kappaphycus alvarezii</i> (o <i>Eucheuma cottonii</i> ), <i>Caulerpa lentillifera</i> , y <i>Sargassum polycystum</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	↓ GSH-Px y peroxidación lipídica en eritrocitos  Hipotensión en pacientes hipertensos (↓Na y ↑K absorción) ↑ Poder reductor y antihipertensivo <sup>9</sup>	Ren y cols. (1994a)  Krotkiewski y cols. (1991) <sup>9</sup> Jimenez-Escrig y cols. (2012)
	Polisacáridos sulfatados	<i>Florideophyceas</i> <sup>9</sup> <i>Porphyra haitanesis</i> 17,4-33,5% sulfato) <sup>11</sup> <i>Ulva pertusa</i> (30-33% sulfato) <sup>11</sup> <i>Fucus vesiculosus</i> (2.4-11.5% sulfato) <sup>12</sup> <i>Laminaria japonica</i> (27-28% sulfato) <sup>13</sup> <i>Ecklonia jurome</i> <sup>14</sup> LMWF- <i>Laminaria japonica</i> <sup>15</sup>	Actividad antioxidante <sup>10,11,12,13,14</sup>  Captadora de radical superóxido <sup>15</sup>	<sup>10</sup> Zhang y cols. (2003) <sup>11</sup> Qi y cols. (2005) <sup>12</sup> Rupérez y cols. (2002) <sup>13</sup> Xue y cols. (2004) <sup>14</sup> Hu y cols. (2001) <sup>15</sup> Xue y cols. (2004) Zhang y cols.(2012)
Polisacáridos totales y alginatos	Polisacáridos totales	<i>Saccharina latissima</i> <i>Sargassum pallidum</i> <i>Laminaria</i> sp. <sup>18</sup>	Actividad antioxidante  Efecto antihipertensivo <sup>18,19</sup>	  <sup>17</sup> Arasaki y Arasaki (1983) <sup>18</sup> Murata y Nakazoe (2001) <sup>19</sup> Ren y cols. (1994a)
	Alginatos/ácido alginico Polímero de dos unidades diferentes de ácidos urónicos (ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico) <sup>17</sup>	<i>Fucus vesiculosus</i> <sup>19</sup> <i>Undaria pinnatifida</i> (24%) <sup>18</sup>		
Polisacáridos fucoidanos/fucanos	Fucoidanos, desde típicos (componentes principales) a fucanos conteniendo heteropolisacáridos tipo sulfato	<i>Laminaria digitata</i> <sup>21</sup> <i>Laminaria japonica</i> <sup>22,26</sup> <i>Fucus</i> sp. <sup>24</sup> <i>Ascophyllum nodosum</i>	Actividad antioxidante <sup>24,25,26</sup>	<sup>20</sup> Nishino y cols. (1994) <sup>21</sup> Matsubara y cols. (2005)

	(elementos menores). Fucooidanos principalmente conteniendo sulfato de L-fucosa, y ácido no urónico <sup>20,21</sup>	<i>Undaria pinnatifida</i> <sup>23</sup> <i>Ulva pertusa</i> <sup>25</sup> <i>Porphyra haitanesi</i> <sup>22</sup> <i>Padina gymnospora</i> <sup>24</sup> (5-6 %w/w de alga en peso seco)		<sup>22</sup> Zhang y cols. (2003) <sup>23</sup> Hu y cols. (2001) <sup>24</sup> Rocha de Souza y cols. (2007) <sup>25</sup> Qi y cols. (2005) <sup>26</sup> Wang y cols. (2008) <sup>27</sup> Ren y cols. (1994b)
Laminaranos/ Laminarina	Polisacáridos ramificados (soluble) y no ramificados (insoluble): β 1-3, β 1-6 glucano. 84-94% de azúcar y 6-9% ácido urónico. Con manitol	<i>Saccharina latissima</i> : 0-33%, 16% <i>Laminaria digitata</i> : 14%, 0-18% <i>Fucus vesiculosus</i> : 84% azúcares totales	↓ presión sistólica <sup>27</sup>	
Porfiranos	Polímeros de ácido sacárido conteniendo grupos sulfato, β 1,3-xilano	<i>Porphyra umbilicalis</i> : 48% <i>Porphyra</i> sp.	↓ presión arterial en ratas hipertensas	<sup>28</sup> Noda (1993)
Péptidos	Dipéptidos	<i>Undaria pinnatifida</i> <sup>29,30</sup> 160 mg/kg <i>Undaria pinnatifida</i>	↓ presión arterial en ratas <sup>29,30</sup> ↓ ECA	<sup>29</sup> Sato y cols. (2002) <sup>30</sup> Suetsuna y cols. (2004)
	Péptidos	<i>Lomentaria Catenata</i> <sup>31</sup> <i>Lithophyllum okamurae</i> <sup>31</sup> <i>Porphyra yezoensis</i> y <i>Hizikia fusiformis</i> <i>Acnophora delilei</i> 200 mg/kg <i>Porphyra yezoensis</i> y <i>Hizikia fusiformis</i> <i>Acnophora delilei</i>	↓ ECA <sup>32</sup> Antioxidante y actividad superóxido dismutasa en un sistema de ácido linoleico <sup>31</sup>	<sup>31</sup> Cha y cols. (2006) <sup>32</sup> Suetsuna y cols. (2004)
Aminoácidos	Laminina Monocitrato de Laminina Aminoácidos tipo Micosporina	<i>Laminaria</i> sp. <sup>33</sup> <i>Chondria</i> sp. <sup>33</sup> <i>Macrocystis integrifolia</i> , <i>Laminaria setchellii</i> , <i>Nereocystis leutkeana</i> (5 mg/ml) <sup>34</sup> (7% algas en dieta), Konbu (45μg As/día) <sup>35</sup>	↓ excitación del músculo liso Efecto hipotensor transitorio <sup>33</sup> Propiedad antioxidante y efecto antiproliferativo <sup>34</sup> ↓ sistema glutatión (Konbu >Nori) <sup>35</sup>	<sup>33</sup> Bakhuni y Rawat (2005) <sup>34</sup> Nakayama y cols. (1999) <sup>35</sup> Bocanegra y cols. (2006)
Minerales	Elementos traza			<sup>36</sup> Jiménez-Escrig y cols. (2012)
Polifenoles	Contenido total fenólico	<i>Pheophyceas</i> <i>Sargassum thunbergii</i> <i>Ecklonia stolonifera</i> <sup>36</sup>	↑ Poder reductor, ↑ captación radicales <sup>36</sup>	
	Florotaninos	<i>Fucus</i> > <i>Laminaria</i> > <i>Undaria</i> > <i>Porphyra</i>	Antioxidante; ↓ lipoxigenasa <sup>37</sup> ↑ Polimerización ↑ Poder antioxidante <sup>38</sup>	<sup>37</sup> Pavia y Aberg (1996) <sup>38</sup> Kang y cols. (2003)

Fuente Sánchez-Muniz y cols. (2013). Los datos en diferentes columnas que llevan misma superíndice pertenecen mismo experimento. DHA, ácido docosahexaenoico; GSH-PX, glutatión peroxidasa; ECA, enzima convertidora de la angiotensina.

### **1.10.1. Efectos de las algas y de los componentes de las algas sobre los niveles plasmáticos de colesterol y lipoproteínas. Efectos antitrombóticos**

Diferentes resultados epidemiológicos han confirmado que existe asociación entre el consumo de algas y otros vegetales con la baja mortalidad cardiovascular (Shimazu y cols., 2007). Las algas pueden ser un elemento fundamental, dentro de una dieta saludable, como alimento para mejorar el fisiologismo de la sangre, el corazón y el sistema circulatorio tanto en humanos como en animales de laboratorio (**Tablas 5 y 6**). Algunos tipos de fibra muestran importantes efectos sistémicos relacionados con sus propiedades hipolipemiantes. Sin embargo, aunque ricas en fibra, no todas las algas muestran estos efectos. Las diferencias en la metodología, diseño del estudio, y animales utilizados en el estudio hacen difícil cualquier generalización. La mayoría de las investigaciones se han realizado en ratas alimentadas con dietas enriquecidas con colesterol y con un moderado-potente efecto hipocolesterolémico, centrándose fundamentalmente en las HDL antiaterogénicas (Tabla 5). El efecto hipocolesterolémico no se observa en los animales alimentados con dietas no enriquecidas en colesterol.

Wong y cols. (1999) evaluaron los cambios en el perfil lipídico de ratas alimentadas con dietas hipercolesterolemicas conteniendo cuatro especies de algas (*Ulva* sp., *Hypnea charoides*, *Colpomenia sinuosa* y *Sargassum hemiphylum*). Los animales que consumieron las algas presentaron mayores concentraciones de HDL-colesterol y de TG que las ratas control. Las ratas alimentadas con *Hypnea* y *Ulva* mostraron una reducción en los niveles séricos de colesterol total, pero sólo la dieta que contenía *Hypnea* disminuyó los valores de LDL-colesterol. Bocanegra y cols. (2009a) demostraron que la incorporación de un 7% de Nori en la dieta enriquecida en colesterol, disminuye los niveles de colesterol y lipoproteínas postprandiales. Sin embargo, este efecto hipocolesterolemico no se observó en ratas alimentadas sin colesterol. Otros autores demuestran que algunas algas no disminuyen los niveles de colesterol sérico, sino que incluso pueden incrementarlo. De acuerdo con algunos resultados de Ren y cols. (1994a) la dieta Konbu tiende a aumentar los niveles de colesterol en plasma en ratas alimentadas con agentes hipercolesterolemicos, lo que sugiere claramente que no todos los tipos de algas actúan como hipolipemiantes.

*Contenido en energía.* Independientemente de la relación entre nutrientes, lípidos, y lipoproteínas ya expuestos en las líneas anteriores, las algas se caracterizan por presentar un bajo contenido energético, menos de 10 g /alga por día (16-25 kcal o 58-

100 kJ). No obstante, algunos componentes de las algas, como los polifenoles, podrían aumentar el efecto termogénico de la dieta e inducir saciedad, y así reducir el balance energético de la dieta con algas.

*Contenido de grasa y ácidos grasos.* Las algas son alimentos conocidos como "pobres", ya que presentan una cantidad de lípidos reducida, menos de un 1,5% de grasa (Bocanegra y cols., 2009b). Sin embargo, la mayoría de las algas son relativamente ricas en PUFA n-3 (20-50% de la grasa total) (Jeong y cols., 1993), y presentan una baja relación omega-6/omega-3 (0.1-1.8) (Holdt y Kraan, 2011; López-López y cols., 2009). La composición y el perfil de ácidos grasos de las diferentes especies depende de factores como las condiciones ambientales, estación del año (Dembitsky, 1991; Bocanegra y cols., 2009 b), momento de la siembra y la recolección (Yoshie y cols., 1994). En general, el perfil de ácidos grasos de las algas difiere del de las plantas terrestres en que las algas tienen una proporción más elevada de AGS y ácidos grasos insaturados (Colombo y cols., 2006; Vanitha y cols., 2007).

Como se ha comentado anteriormente, uno de los principales efectos de los AGP omega-3 en la salud humana es su papel importante en la reducción de los lípidos sanguíneos (Harris, 1997; Sánchez-Muniz, 2003). Las principales fuentes de EPA y DHA en la dieta humana son los productos del mar (Holdt y Kraan, 2011), constituyendo casi un 50% del contenido total de ácidos grasos. Por lo tanto, los efectos antes mencionados del consumo de algas parecen estar relacionadas, al menos parcialmente, con la ingesta de AGP omega-3.

Algunas especies unicelulares de algas, de diferentes grupos taxonómicos, producen altas cantidades de AGP por lo que pueden ser consideradas como ingredientes funcionales susceptibles de ser utilizados para el desarrollo de alimentos con efectos beneficiosos para la salud. La obtención de aceites enriquecidos con DHA a partir de algas ha dado lugar comercialmente a alimentos nutracéuticos disponibles para niños y ancianos (Werman y cols., 2003). Werman y cols. (2003) demostraron que el consumo de dietas suplementadas con el alga unicelular *Nannochloropsis* sp. produce una reducción significativa de los niveles de colesterol plasmático y hepático, tanto con el alga entera como con su extracto lipídico. El aceite procedente de la microalga *Schizochytrium* sp. está autorizado por la UE como nuevo ingrediente alimentario, debido al alto contenido en DHA (Decisión de la Comisión de 5 de junio de 2003) escualeno y fitosteroles, y un contenido en colesterol tres veces inferior al encontrado en el aceite de pescado (Conchillo y cols., 2006).

Sin embargo, los pacientes hiperlipémicos e hipertensos deben consumir cantidades relativamente elevadas de AGP omega-3 con el fin de observar efectos terapéuticos (Harris, 1997), por lo que una ingesta normal de algas sería parcialmente ineficaz en esos pacientes, aunque no se deben descartar sus propiedades antiinflamatorias y otros efectos pleiotrópicos (Villalobos y cols., 2010). Como se ha comentado anteriormente, el consumo de 5 a 10 g/día de algas suministraría 80-180 mg/día de AGP omega-3, aproximadamente 1,3 a 1.2 de las recomendaciones diarias (FAO/OMS, 2010).

El *contenido y el tipo de esteroides* varían con las especies de algas. Esteroides como  $\beta$ -sitosterol y fucosterol reducen los niveles de colesterol plasmático tanto en los animales de experimentación como en seres humanos (Whittaker y cols., 2000).

*Contenido de hidratos de carbono* en las algas. El contenido de estos macronutrientes en las algas es relativamente elevado (33-75% materia seca). Sin embargo, la digestibilidad de estos hidratos de carbono es baja (Jiménez-Escrig y Goñi, 1999; Lahayen y Kaeffer, 1997); por lo tanto, las algas no se pueden considerar como alimentos potencialmente energéticos o fuente de hidratos de carbono digeribles.

*Contenido de Fibra dietética.* Son numerosas las publicaciones que demuestran la asociación entre la fibra dietética y la reducción de los niveles de colesterol, y la mejora del estado de salud de la población (Brunner y cols., 2007; Sánchez-Muniz, 2012). De hecho, existe evidencia epidemiológica sobre la relación entre el consumo de algas y la baja mortalidad cardiovascular en los japoneses (Shimazu y cols., 2007). Las principales propiedades físico-químicas de la fibra dietética que tienen importancia nutricional, dependen de su capacidad para absorber y retener el agua, capacidad de intercambio iónico, viscosidad y capacidad para absorber compuestos orgánicos como colesterol y glucosa, y aumentar el volumen fecal (Dreher, 1987; Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000; Bocanegra y cols., 2009b). Estas propiedades conducen a efectos potencialmente beneficiosos locales (tracto gastrointestinal) y sistémico (disminución del colesterol sérico y un mejor control glucémico) (James y cols., 2003).

Los mecanismos de acción de la fibra incluyen entre otros la capacidad de formar geles en el estómago e intestino delgado, poder de fermentación por las bacterias del colon, su efecto "limpieza tipo esponja" y capacidad para inducir cambios concomitantes en otros aspectos de la dieta (Bocanegra y cols., 2009b; Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000). Con respecto a la absorción de grasa, hay evidencias de que la adición de algas a la dieta de animales de experimentación aumenta significativamente



el porcentaje de grasa en las heces, lo que indica una disminución en la digestibilidad de la grasa aparente de la dieta de estos animales (Gudiel-Urbano y Goñi 2002).

Además, otros posibles factores relacionados con el efecto hipocolesterolemiante de algunas algas son su capacidad de fermentación y la capacidad de producción de ácidos grasos de cadena corta, tales como el ácido propiónico que disminuye la síntesis endógena de colesterol en roedores (Sánchez-Muniz, 2012). La fibra fermentable del alga puede contribuir a las propiedades hipocolesterolemiantes de estos vegetales. Bocanegra y cols. (2003) encontraron algas en el colon de todos los animales alimentados con Konbu, y una ausencia completa de algas en el colon de ratas alimentadas con Nori, lo que sugiere que la fermentabilidad de Nori, y por lo tanto su capacidad hipocolesterolemiante, fue mayor que la de Konbu. Sin embargo, como indica también Sánchez-Muniz (2012), comentando un trabajo de Zhang y cols. (1992), la cantidad de ácido propiónico generado por la fibra en humanos es baja y, por lo tanto, la reducción de la biosíntesis de colesterol por este ácido graso de cadena corta.

Algunos estudios han demostrado que las fibras dietéticas con capacidad de intercambio iónico son especialmente eficaces en la reducción de los niveles de colesterol sérico (Guillon y Champ, 2000). Algunos tipos de fibra presentan importantes efectos sistémicos relacionados con sus propiedades hipolipemiantes.

Varios autores han indicado que fracciones acuosas de las algas o polisacáridos aislados de algas inducen efectos hipocolesterolemiantes en animales de experimentación (Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000; Wong y cols., 1999; Ardiansyah y cols., 2006). Sin embargo, existen muy pocos estudios controlados en humanos disponibles. Oben y cols. (2007) encontraron que los individuos que recibieron una infusión ProAlgaZyme mostraron menores niveles de colesterol total, LDL-c y TG, y valores de HDL-colesterol más altos que los que recibieron agua como placebo.

De acuerdo con Ito y Tsuchiya (1972) y con Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz (2000) los niveles de colesterol plasmático y la excreción fecal de los principales esteroides disminuyen en las ratas alimentadas con una dieta enriquecida en colesterol y polisacáridos de algas. Así, el alginato de sodio, funorano, porfirano y carragenina interactúan con el colesterol dietético para facilitar su excreción, mientras que no se observó ningún efecto en la dieta con agar. Ren y cols. (1994a) mostraron los efectos hipolipemiantes de algunos polisacáridos de algas en ratas alimentadas con una dieta rica en sodio y colesterol, se redujo el riesgo aterogénico y se observó un ligero aumento de HDL-colesterol. De acuerdo con Ren y cols. (1994b), estos resultados se

pueden atribuir a la retención de colesterol de la dieta por los polisacáridos capaces de formar coloides iónicos y a la excreción incrementada de este esteroide por las heces. Se puede esperar que no sólo el colesterol de la dieta, sino también el colesterol biliar, junto con los ácidos biliares pueden ser retenido por la fibra de algas (Sánchez-Muniz, 2012). Sin embargo, otros autores indican que algunas algas no reducen el colesterol, y de hecho, puede aumentarlo (Wong y cols., 1999; Ren y cols., 1994b). Los resultados comentados en ratas alimentadas con Nori y Konbu sobre los lípidos plasmáticos postprandial (Bocanegra y cols., 2009a) deben estar relacionados con el alto aporte de fibra de las algas, y fundamentalmente con los diferentes polisacáridos de la fibra.

Las algas sintetizan una variedad de polisacáridos sulfatados, los cuales suelen mostrar potente actividad anticoagulante, disminuyen el LDL-colesterol en ratas y previenen la obesidad y la diabetes (Murata y Nakazoe, 2001, Ghosh y cols., 2009). El alga roja *Mastocarpus stellatus* tiene 72% de fibra soluble formada principalmente por carragenanos y galactanos sulfatados. La ingesta de *Mastocarpus* en ratas produce una mejora del perfil lipídico en el suero, disminuyendo el colesterol y los triglicéridos (Gómez-Ordoñez, 2012).

Los alginatos y el ácido algínico extraídos de las algas marrones no se encuentran en las plantas terrestres. Estos polisacáridos dietéticos están disponibles como ácidos y sales. Se ha demostrado que el ácido algínico disminuye la colesterolemia, ejerce efectos hipotensores, y juega un papel importante en el mantenimiento de la salud (Kim y Lee, 2008; Murata y Nakazoe, 2001). El ácido algínico absorbe sustancias como el colesterol, que luego son eliminadas del aparato digestivo (Burtin 2003; Ito y Tsuchida 1972) y dan lugar a una respuesta hipocolesterolemizante y hipolipemizante (Kiriya y cols., 1969; Lamela y cols., 1989), junto con un aumento en el contenido de colesterol fecal y una respuesta hipoglucémica (Dumelod y cols., 1999; Ito y Tsuchida, 1972). Además, alginatos con pesos moleculares  $\geq 50$  kDa podrían prevenir la obesidad, hipercolesterolemia y diabetes (Kimura y cols., 1996).

Los estudios sobre el efecto de los alginatos en la coagulación de la sangre y activación plaquetaria han demostrado que dependen de la relación entre el ácido manurónico y gulurónico en la cadena de la molécula, así como de la concentración de calcio. Por otra parte, los alginatos normalizan las concentraciones de glucógeno y de lípidos en el hígado (Khotimchenko y cols., 2001).

Entre otras propiedades, las carrageninas presentan actividad anticoagulante e inhiben la agregación plaquetaria (Hawkins y cols., 1962; Hawkins y Leonard, 1963; Bondad y cols., 1979). La base principal de la actividad anticoagulante de la carragenina es su propiedad anti-trombótica. La  $\lambda$ -carragenina muestra una mayor actividad anti-trombótica que la  $\kappa$ -carragenina, probablemente debido a su mayor contenido de sulfato (Holdt y Kraan, 2011).

El agar-agar es un producto alimenticio típico en Japón. Holdt y Kraan, (2011) han demostrado que el agar-agar disminuye la concentración de glucosa en la sangre y ejerce un efecto antiagregante.

Es conocida la bioactividad de los fucoidanos para la salud humana. Así, fucoidanos de *Undaria* y *Laminaria* muestran propiedades anticoagulantes (Holdt y Kraan, 2011, Chevolot y cols., 1999, Zhuang y cols., 1995). Sin embargo, los fucoidanos, para unirse a la trombina (un factor principal de la coagulación), deben estar polimerizados (Holdt y Kraan, 2011). Cumashi y cols. (2007), utilizando un modelo de rata, demostraron las propiedades antiinflamatorias de fucoidanos obtenidos a partir de nueve especies de algas marrones. Según estos autores, todos los fucoidanos presentan actividad anticoagulante, mientras que sólo los de *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Fucus serrato*, *F. distichus* y *F. evanescens* mostraron fuerte actividad antitrombínica. Un estudio adicional demostró que los polisacáridos de la fucosa sulfatada, aislados a partir de *Ecklonia cava*, inhiben fuertemente la actividad de los factores de coagulación mediante la interacción con la antitrombina III, tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca de la coagulación (Jung y cols., 2007). Los fucoidanos mejoran la actividad antitrombina III en ambas vías de la coagulación. Esto contribuye a su alta actividad anticoagulante. Wijesinghe y cols. (2011) demostraron *in vivo* la actividad anticoagulante del polisacárido rico en fucosa sulfatado obtenido a partir de *E. cava*. También hay estudios que han informado de la actividad anticoagulante y antitrombínica de fucanos con diferentes contenidos de sulfato (Nishino y Nagumo, 1992).

La laminarina reduce los niveles de lípidos en sangre (Hoffmane y cols., 1995). También otros autores como Besterman (1970), Ren y cols. (1994a) han descrito que la laminarina disminuye los niveles de colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos. Las respuestas hipocolesterolemizante e hipolipemizante de las laminarinas se han relacionado con la reducción de la absorción de colesterol en el intestino (Kiriya y cols., 1969; Lamela y cols., 1989; Panlasigui y cols., 2003), junto con un aumento en el contenido de

colesterol fecal y una respuesta hipoglucémica (Dumelod y cols., 1999; Ito y Tsuchida 1972; Nishide y cols., 1993). Los porfiranos puede reducir significativamente el colesterol en sangre en ratas hipercolesterolémicas (Noda, 1993).

*Proteínas de las algas.* Vahouny y cols. (1985) y Kritchevsky y cols. (1982) sugirieron que las proteínas que muestran una baja relación lisina/arginina son hipocolesterolemiantes y reducen la infiltración de lípidos. Teniendo en cuenta el perfil de aminoácidos de varias algas (Bocanegra y cols., 2009b; Holdt y Kraan, 2011) se puede calcular que la mayoría de las algas consiguen una relación lisina/arginina similares a la proteína de soja, pero inferior a la mayoría de las proteínas de origen animal. Por lo tanto, *Porphyra* sp, *Laminaria* sp y *Himanthalia* sp. muestran proporciones de 0,83 a 1,18 mientras que la proteína de soja y caseína (proteínas estándar con efectos hipo e hipercolesterolemiantes, respectivamente), presenta una relación lisina/arginina de 0,81 y 2,0, respectivamente. La especie *Laminaria* con una proporción de lisina/arginina más elevada que la *Porphyra* o *Himanthalia* no ejerce efectos reductores del colesterol plasmático en ratas alimentadas con una dieta enriquecida en colesterol y suplementada con un 7% de alga (Bocanegra y cols., 2009a). Además la infiltración lipídica hepática se redujo sustancialmente por Nori (*Porphyra* sp.), pero no por Konbu (*Laminaria* sp.) (Bocanegra y cols., 2006; 2009b), lo que sugiere la importancia de la relación lisina/arginina en el metabolismo de las lipoproteínas y en la infiltración lipídica.

La taurina, también presente en las algas, es importante para la formación de la bilis, por el cual el colesterol es eliminado. Este aminoácido ha demostrado efectos hipocolesterolemiantes (Lourenço y Camilo, 2002; Mouritsen, 2009) La taurina conduce a una disminución de la concentración de colesterol en el suero y en el hígado de rata, presentando efectos preventivos sobre la enfermedad vascular, hepatitis crónica, y diabetes (Mochizuki y cols., 1999). Sánchez-Muniz y cols. (2002) atribuyeron, entre otros factores, el efecto hipocolesterolemiantes de sardinas fritas a su alto contenido de taurina.

*Minerales en las algas.* Se ha planteado que la aterosclerosis es una enfermedad relacionada con el desequilibrio metabólico entre Zn y Cu (Klevay, 1975). Esta hipótesis fue corroborada en recién nacidos con niveles altos de colesterol en suero y se correlacionaron con una alta relación Zn/Cu en suero (Bastida y cols., 2000). Los niveles de HDL-c neonatal también se relacionaron con los valores de hierro en suero (Bastida y cols., 2000). Datos de nuestro grupo (Bocanegra y cols., 2003; 2008) indican

que la relación Zn/Cu de la ingesta dietética, la absorción neta de hierro, y los niveles de colesterol en plasma, fueron menores en las ratas alimentadas con Nori que en las alimentadas con Konbu, lo que sugiere que la proporción de minerales y la biodisponibilidad de hierro pueden influir en la colesterolemia. El exceso o el defecto de hierro puede ser perjudicial desde un punto de vista cardiovascular (Toxqui y cols., 2010).

Otros minerales, tales como el cromo, también juegan un papel importante en la colesterolemia (Albarracín y cols., 2007). El efecto hipocolesterolémico de las algas se puede explicar al menos en parte en su riqueza en  $\text{Cr}^{+2}$ . El consumo a largo plazo por ratones de una dieta rica en colesterol, aumenta la captación hepática de cromo, hierro, arsénico y yodo, mientras que disminuye la de zinc y selenio (Weginwar y cols., 2002). Cuando se comparó el metabolismo de los elementos traza en ratones hiper y normocolesterolémica, se encontraron correlaciones positivas significativas entre la concentración de triglicéridos en suero y la captación hepática de cromo, hierro, arsénico y mientras que se observó una correlación negativa para la absorción de zinc. Se encontró una correlación positiva significativa entre las concentraciones séricas de de las HDL y LDL y la absorción renal de cromo (Weginwar y cols., 2002).

*Vitaminas en las algas.* Las algas son ricas en vitaminas hidrosolubles (Bocanegra y cols., 2009b). Aunque varias vitaminas están involucradas en la síntesis de lípidos y colesterol, no se conoce el posible papel del contenido vitamínico de las algas sobre el colesterol y lipoproteínas plasmáticas. Pruebas recientes sugieren que la homocisteinemia se asocia con disfunción endotelial y que este efecto es revertido por suplementos orales de folato. También se le han atribuido propiedades antioxidantes. Además, otros ensayos demostraron que el folato y la vitamina B<sub>6</sub> protegen contra la enfermedad coronaria (Ubbink y cols., 1993). La homocisteína ha recibido mucho interés en las últimas décadas debido a que la hiperhomocisteinemia se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedades como la enfermedad cardiovascular, renal y procesos neurodegenerativos (Welch y Loscalzo, 1998).

Las algas frescas son ricas en ácido fólico, pero ésta es una vitamina muy lábil ya que al contacto con el aire desaparece su acción. Skrovánková (2011) indica que las algas son fuentes importantes de vitamina B<sub>12</sub>, así *Porphyra* sp. presenta un alto contenido 133,8 mg g B<sub>12</sub>/100 ms en forma activa (Miyamoto y cols., 2009). Otros autores informaron que el contenido de vitamina B<sub>12</sub> en estas algas se encuentra entre 12,0 - 68,8 mg/100 g de ms (Watanabe y cols., 2002, 2007). Sin embargo, con respecto

a la biodisponibilidad de la vitamina B<sub>12</sub> en las algas, la información disponible es controvertida, por ejemplo, las algas contienen análogos estructurales de la cobalamina (corrinoídes). Estos corrinoídes no poseen el ion cobalto y no muestran actividad B<sub>12</sub> en humanos (Kanazawa y Herbert, 1983). No obstante, se han encontrado niveles bajos de homocisteína en personas acostumbradas a comer algas en el marco de una dieta rica en verduras (Broekmans y cols., 2000).

*Otros antioxidantes.* No existe información sobre las propiedades hipocolesterolemiantes de los polifenoles de las algas en el ser humano. El hidroxitirosol obtenido del aceite de oliva disminuye, de una forma dosis-dependiente, los lípidos plasmáticos, principalmente los triglicéridos y aumenta los niveles de HDL-colesterol (Covas y cols., 2006). Por lo tanto, se podría especular que los polifenoles de algas podrían ejercer efectos similares.

Wei y cols. (2011) propusieron que los florotaninos de alto peso molecular del alga *Sargassum thunbergii* tiene efectos hipocolesterolemiantes y su mecanismo se basa principalmente en el aumento de los niveles del receptor de LDL en el hígado. Estos resultados mostraron que los florotaninos altamente polimerizados podrían reducir significativamente el colesterol total y los niveles de TG y disminuir el nivel de LDL-c de forma muy significativa. Estos autores indicaron que estos florotaninos aumentan los niveles del receptor de LDL en el hígado, pero no fueron capaces de bloquear la síntesis de inhibidores de la HMG-CoA reductasa, lo que excluye una influencia relevante sobre la biosíntesis de colesterol celular. Yoon y cols. (2008) han investigado los efectos de los extractos etanólicos de *Ecklonia stolonifera* y sus constituyentes florotaninos, eckol y dieckol, sobre los niveles de lípidos en suero de ratas hiperlipidémicas. Estos resultados sugieren que eckol y dieckol se pueden utilizar como nutracéuticos en la prevención de la aterosclerosis hiperlipidémica.

Diferentes ficobiliproteínas han demostrado actividad antiinflamatoria, hipocolesterolemiante, protectora hepática, y actividad inhibitoria de la lipasa (Sekar y Chandramohan, 2008).

### **1.10.2. Efecto de las algas y sus compuestos sobre la presión arterial**

La información del efecto antihipertensivo de las algas en animales de laboratorio es mucho más reducida que la del efecto hipolipemiante, ya que se requiere cierta habilidad y entrenamiento por parte del manipulador así como una adaptación mayor por parte de los animales. Los efectos antihipertensivos de las algas han sido vinculados

a la absorción excesiva de sustancias “dañinas” como el sodio o a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual es cardinal en el control de la presión arterial (González-Muñoz y cols., 2010; Ródenas y cols., 2011). La cantidad de minerales en las algas es muy diferente y dependiente de la especie, condiciones ambientales, lugar de cosecha y calidad del agua (Ródenas de la Rocha y cols., 2009; Larrea-Marín y cols., 2010). El contenido mineral en las algas marinas es muy elevado en comparación con los vegetales terrestres.

*Hidratos de carbono y fibra.* La fibra dietética disminuye la presión arterial (Sánchez-Muniz, 2012). Varios autores han comprobado que los extractos acuosos de las algas marinas o los polisacáridos aislados inducen efectos antihipertensivos en animales de experimentación (Ardiansyah y cols., 2006). Noda (1993) demostró en ratas hipertensas que los porfiranos obtenidos de las distintas algas reducen la presión arterial. También, Ren y cols. (1994a) observaron efectos hipotensores de algunos polisacáridos aislados de algas en las ratas alimentadas con una dieta rica en sodio y colesterol. Estos autores sugieren que el sodio en la dieta es retenido por los polisacáridos limitando su absorción y por lo tanto, su efecto sobre la presión arterial.

El efecto antihipertensivo de la fibra del alga parda *A. nodosum* fue investigado en pacientes levemente hipertensos por Krotkiewski y cols. (1991), quienes señalaron que la presión arterial sistólica se redujo significativamente al final del experimento. La disminución de la presión arterial sistólica estuvo relacionada con una menor absorción intestinal de sodio y mayor absorción intestinal de potasio, ya que la fibra de *A. nodosum* es capaz de liberar potasio y capturar sodio del medio ambiente.

Ren y cols. (1994a) observaron que la presión arterial sistólica de los animales alimentados con dietas que incluían funorano, fucoidano, alginato y porfirano, fue notablemente más baja que la de los animales del grupo de control. En otro estudio, Ren y cols. (1994b) también demostraron que los funoranos muestran un fuerte efecto antihipertensivo. Según Kim y Lee (2008) y Murata y Nakazoe (2001) los alginatos ejercen efectos hipotensores. Los laminaranos disminuye la presión arterial sistólica (Hoffmane y cols., 1995), mientras que los porfiranos puede reducir significativamente el efecto hipertensor en ratas (Noda, 1993).

El efecto potencialmente saciante del consumo de algas podría jugar algún papel en la presión arterial, ya que la disminución de peso corporal se asocia a la reducción de la presión arterial (Serrano Ríos y cols., 2011). Sin embargo, la información en esta materia es muy escasa.

*Proteína de las algas*. Sato y cols. (2002) y Suetsuna y cols., (2004) sugirieron que 10 dipéptidos obtenidos de un extracto acuoso en caliente de *U. pinnatifida* reducían la presión arterial en ratas genéticamente hipertensas y mostraron actividad inhibidora de la ECA. También han sido aislados de *Phorphyra yezoensis* y *Hizikia fusiformis* péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Suetsuna, 1998). A su vez, extractos acuosos obtenidos de 10 algas verdes y 19 algas marrones mostraron actividad inhibidora de la ACE, destacando sobre todo los de *E. cava* (Cha y cols., 2006).

La taurina presente en grandes concentraciones en las algas rojas ha sido identificada como antihipertensiva, pero el mecanismo implicado sigue siendo incierto (Lourenço y Camilo, 2002).

Algunos aminoácidos bioactivos como la laminina aislados de algunos géneros de *Laminaria* y *Chondria* (Bhakuni y Rawat, 2005) reducen la contracción de los músculos lisos excitados. Además, el monócitrato de laminina muestra efectos hipotensores transitorios (Bhakuni y Rawat, 2005).

### **1.10.3. Propiedades antioxidantes de las algas marinas y sus componentes**

Multitud de síndromes y enfermedades como el cáncer, arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, lesiones hepáticas, etc., se han relacionado con el estrés oxidativo (Ross, 1999; Barry y Gutteridge, 1989). El aumento de la oxidación de lipoproteínas constituye uno de los principales factores de riesgo para la aterosclerosis (Ross, 1999). La AE, una de las actividades enzimáticas de la paraoxonasa-1 (PON-1) (Canales y Sánchez-Muniz, 2003), juega un papel protector frente a la peroxidación de las LDL y otras lipoproteínas (Canales y Sánchez-Muniz, 2003; Nus y cols., 2006; Nus y cols., 2008; Nus y cols., 2007).

Ha sido bien establecido que los antioxidantes disminuyen significativamente la aterogénesis en conejos, hamsters, ratones y primates no humanos (Chisolm y Steinberg, 2000). Las algas marinas en respuesta a las condiciones altamente oxidativas en que viven, han desarrollado fuertes sistemas antioxidantes de defensa y, por tanto sus componentes, pueden ayudar en la protección de las ECV (Matsukawa y cols., 1997). Se ha visto que polisacáridos presentes en algas pardas como fucoidanos, laminaranos y ácido alginico presentan elevada actividad antioxidante *in vitro* (Rupérez y cols., 2002; Rocha De Souza y cols., 2007; Wang y cols., 2010), pudiendo ser considerados como antioxidantes potenciales de gran poder en sistemas *in vivo*. Nuestro grupo ha observado en ratas efectos controvertidos sobre el sistema de glutatión de la ingesta de dietas



enriquecidas en algas. Así, Konbu y en menor grado Nori, utilizadas como suplemento dietético en ratas Wistar disminuyeron la actividad de dicho sistema (Bocanegra y cols., 2006). Sin embargo, en el mismo estudio, Bocanegra y cols. (2006) encontraron que en dietas hipercolesterolemiantes enriquecidas con algas existía un aumento de la enzima GSH-Px, coincidiendo con los hallazgos de Mahfouz y Kummerow (2000). La GSH-Px es una de las principales enzimas que participan directamente en la defensa antioxidante *in vivo*, lo que sugiere que puede disminuir la peroxidación lipídica y la formación de oxisteroles. Sin embargo, la AE aumentó en las ratas alimentadas con dietas añadidas o no con colesterol, pero suplementadas con algas (Bocanegra y cols., 2009a). Estos autores concluyeron que la presencia de antioxidantes y otros compuestos fitoquímicos de las algas explicaría, al menos en parte, la mayor actividad de AE en ratas alimentadas con Nori y con Wakame frente a los animales control. Diversos autores demostraron que la actividad AE aumenta en ratas que consumieron polifenoles de la granada (Rock y cols., 2008).

Algunos compuestos bioactivos obtenidos de extractos de algas presentan capacidad para neutralizar los radicales libres tipo superóxido e hidroxilo, lo que explicaría la estabilidad de estos productos frente a la oxidación durante el almacenamiento (Ramarathanam y cols., 1995). Jiménez-Escrig y cols. (2012) determinaron las propiedades antioxidantes de extractos orgánicos y acuosos de algas pardas y rojas. De acuerdo con estos autores, después de realizar un "Análisis de componentes principales" en Pheophyceas, los compuestos fenólicos estaban implicados en la correlación encontrada entre la reducción de la actividad captadora de radicales y el contenido de fenoles totales. Destacaba en las Florideophyceas, el papel reductor de los polisacáridos que contenían sulfato. Además, la variación química de los taxones de las algas, ha demostrado que grupos específicos presentes en ellas, como polifenoles y derivados sulfato, muestran actividad antioxidante.

*Aminoácidos.* El glutatión y la carnosina, dos péptidos antioxidantes, que generalmente están presentes en altas concentraciones en el músculo animal, se han encontrado también en macroalgas marinas (Holdt y Kraan, 2011). Entre las sustancias naturales con propiedades antioxidantes se encuentran, especialmente en macroalgas rojas, los aminoácidos tipo micosporina (Nakayama y cols., 1999). Una de las funciones más importantes de la taurina reside en su capacidad para atrapar moléculas prooxidantes (Lourenço y Camilo, 2002), aunque su mecanismo de acción todavía no se ha clarificado.

*Polisacáridos.* En los últimos años, muchos estudios han demostrado que los polisacáridos de las algas desempeñan un papel importante como captadores de radicales libres y antioxidantes en la prevención del daño oxidativo en los organismos vivos (Aguilera y cols., 2002; Zhang y cols., 2003; Xue y cols., 2004).

Los polisacáridos sulfatados de las algas *Porphyra haitanensis* (Zhang y cols., 2003), *Ulva pertusa* (Qi y cols., 2005), *Fucus vesiculosus* (Rupérez y cols., 2002), *Laminaria japonica* (Xue y cols., 2004) y *Ecklonia kurome* (Hu y cols., 2001) han mostrado actividad antioxidante. El fucoidano, un polisacárido compuesto principalmente de L-fucosa sulfatada, parece ser un excelente antioxidante natural ya que presenta una actividad antioxidante significativa en experimentos *in vitro* (Holdt y Kraan, 2011). Los fucanos mostraron efecto antioxidante, pero inferior a los fucoidianos (Rocha de Souza y cols., 2007). Diferentes estudios han demostrado que el peso molecular y el grado de sulfatación podrían tener un efecto significativo sobre la actividad antioxidante de los polisacáridos sulfatados de algas (Wang y cols., 2008). Algunos alginatos son capaces de inhibir la peroxidación lipídica en el hígado (Khotimchenko y cols., 2001).

Zhao y cols. (2004), mediante hidrólisis ácida suave, han obtenido de la *Laminaria japonica* un polisacárido sulfatado de bajo peso molecular (LMWF). Los datos mostraron que este compuesto presenta propiedades captadoras de radicales superóxido, hidroxilo y hipocloroso *in vitro*. Se sugirió que la actividad antioxidante del LMWF estaba relacionada con el efecto hepatoprotector del compuesto en un modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y D-galactosamina (D-Gal) (Zhao y cols., 2004). En un estudio de la actividad protectora de una fracción F1 de un polisacárido galactano-sulfatado del alga *Porphyra haitanensis*, se evidenció un efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica, con una reducción significativa de los niveles de MDA y un incremento en la capacidad antioxidante total en ratones envejecidos. Resultados similares fueron observados por Quanbin y cols. (2004) estudiando la fracción F1 de este polisacárido. Gómez Ordoñez (2012) sugiere que el efecto antioxidante observado en el intestino grueso de ratas alimentadas con el alga roja *Mastocarpus stellatus* se relaciona con el alto contenido de galactanos sulfatados.

*Vitaminas liposolubles.* El contenido de vitaminas liposolubles, como la vitamina E, pudiera contribuir a las propiedades antioxidantes de las algas (Morgan y cols., 1980; Indergaard y Minsaas, 1991). También se puede atribuir la actividad antioxidante de las algas a su contenido en carotenoides totales (Morgan y cols., 1980;

Yan y cols., 1999). Por otra parte, se ha relacionado la presencia de compuestos polifenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos y cinámicos en diferentes especies y géneros de algas marinas con la actividad antioxidante (Yoshie y cols., 2000; Nakamura, 1996). Diversos autores como Holdt y Kraan, (2011) revelan que el contenido de polifenoles y carotenoides de la dieta es beneficioso sobre el estrés oxidativo, y que éste repercute de forma positiva en algunas enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares.

*Polifenoles.* Las algas verdes y rojas, en comparación con las algas pardas, contienen bajas concentraciones de polifenoles (<1% peso seco) pudiendo llegar hasta el 14% peso seco, en especies de *Ascophyllum* y *Fucus* (Holdt y Kraan, 2011). Desde hace tiempo se ha asociado la ingesta rica en polifenoles con una reducción del riesgo cardiovascular consecuencia de estrés oxidativo. La actividad antioxidante de polifenoles extraídos de algas pardas y rojas se ha demostrado en una gran cantidad de estudios. Ye y cols. (2008) investigaron la actividad antioxidante de los polifenoles extraídos de varias algas recolectadas en Dinamarca (*Fucus*, *Sargassum* y *Laminaria*) utilizando diferentes modelos *in vitro*. Se determinó que la actividad antioxidante de los extractos examinados era mayor en la especie *Fucus*.

Los florotaninos son los polifenoles más ampliamente descritos de las algas pardas (Yoshie y cols., 2000; Nakamura, 1996) teniendo un gran abanico de propiedades biológicas, pero de todas ellas, la más destacable es su papel como antioxidantes (Pavia y Aberg, 1996; Kang y cols., 2003). La actividad antioxidante de los taninos se incrementa a medida que el grado de polimerización aumenta. Esta correlación sugiere que a pesar de que las algas contienen antioxidantes como el ácido ascórbico, los carotenoides, etc., los florotaninos también influyen en su acción antioxidante total.

La actividad captadora del radical DPPH fue mayor para las algas analizadas *Fucus* > *Laminaria* > *Undaria* > *Porphyra*. En el caso de *Chondrus*, no se detectó ninguna actividad. Por lo tanto, la capacidad captadora de radicales libres de algas marinas pardas era claramente superior a la de algas rojas.

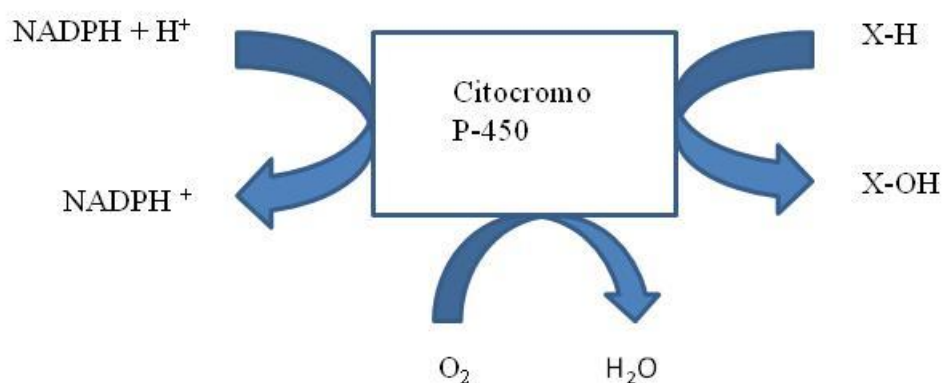
Yuan y cols. (2005) informaron que extractos solubles del alga roja *P. palmata* presentan actividad captadora de radicales libres tipo hidroxilo, así como una inhibición de la peroxidación lipídica, atribuibles al poder reductor de los polifenoles presentes en dicha alga. Los polisacáridos sulfatados de las algas rojas tiene aplicaciones en la

alimentación (Rupérez y cols., 2002). Diferentes ficobiliproteínas han demostrado que presentan actividad antioxidante (Sekar y Chandramohan, 2008).

A pesar del efecto beneficioso de las algas atribuido a sus propiedades antioxidantes, diversos estudios sugieren que la ingesta elevada de estos vegetales puede ser tóxica. Las elevadas concentraciones de arsénico presente en muchas algas, son perjudiciales cuando se encuentran en forma orgánica (valencia atómica III), ya que interfieren con el mecanismo endógeno de la defensa antioxidante. Las concentraciones de glutathione reducido y total fueron más bajas en ratas normo- e hipercolesterolémicas alimentadas con Konbu que en sus respectivos controles que recibieron celulosa como fibra dietética (Bocanegra y cols., 2006). Esto explicaría el efecto negativo del alga Konbu sobre la capacidad antioxidante total. De acuerdo con Nikaido y cols. (2003), el arsénico bloquea el sistema del glutathione. La ingesta elevada de arsénico (45 mg/día) en ratas alimentadas con alga Konbu está relacionada con la disminución de glutathione reducido observado por nuestro grupo de investigación (Bocanegra y cols., 2006). Varios autores han demostrado que la actividad de la enzima GSH-Px disminuyó en las ratas alimentadas con un 2% kelpo (*Laminaria religiosa*) (Maruyama y cols., 1991) y en ratones envejecidos alimentados con el alga roja *P. haitanensis* (Zhang y cols., 2004). Todos estos resultados sugieren un peligro potencial del uso indebido de algas en medicaciones realizadas a base de hierbas.

### **1.11. EFECTOS DEL COLESTEROL DIETÉTICO SOBRE EL ESTATUS ANTIOXIDANTE Y EL PERFIL LIPOPROTEICO**

Como se ha comentado en el apartado 1.8, el hígado juega un papel vital en la eliminación del colesterol sérico al captar por diferentes mecanismos las lipoproteínas plasmáticas (Figuras 7 y 9). Una vez se encuentre el colesterol en el hígado, éste puede ser esterificado, emplearse en la producción de ácidos biliares o reutilizarse para la síntesis de VLDL y HDL como ya se ha descrito. Uno de los mecanismos más controvertidos en relación con la eliminación de colesterol vía biliar es su conversión a ácido cólico por acción de una hemooxigenasa acoplada al citocromo P-450 (**Figura 14**), en particular a la isoenzima CYP7A1 (Gil, 2010). Durante este proceso se producen radicales libres que deben ser neutralizados por los sistemas antioxidantes ya comentados. Este mecanismo prooxidante ha sido muy poco citado en bibliografía, pero debemos decir que es una moneda metabólica que el cuerpo debe pagar para liberarse de una molécula necesaria para la vida, pero también dañina cuando está en exceso.



**Figura 14.** Esquema simplificado del citocromo P-450. NADP: nicotinamida adenindinucleótido-fosfato; NADPH: nicotinamida adenindinucleótido-fosfato reducido. Adaptado de Gil (2010).

Varios son los factores descritos que pueden regular la síntesis hepática de colesterol, entre ellos destacan, por el planteamiento experimental de esta memoria, el colesterol presente en la dieta, que provocaría una disminución en la síntesis endógena de dicho esterol. Así, según Gould y cols. (1959), el colesterol libre celular es un regulador directo de la biosíntesis del colesterol.

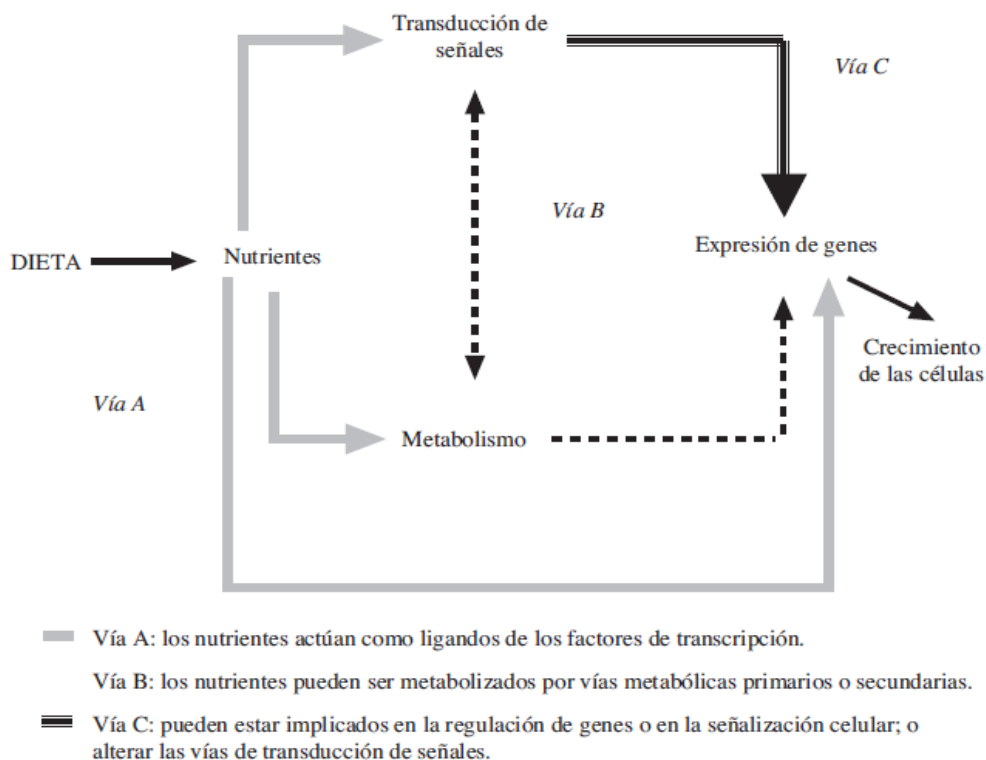
El consumo de colesterol de la dieta incrementa el tamaño de las LDL (Herron y cols., 2004; Zanni y cols., 2004; Greene y cols., 2006). Además, el colesterol también altera el número de partículas LDL tanto grandes como pequeñas (Herron y cols., 2004; Zanni y cols., 2004).

### 1.12. INTERACCIÓN DIETA-GENÉTICA

Numerosos estudios epidemiológicos confirman la existencia de cierta asociación entre la dieta ingerida y la incidencia y severidad de las enfermedades crónicas (Stover, 2004). En la actualidad se investiga por qué algunas dietas causan efectos más beneficiosos en unos individuos respecto a otros en la prevención y tratamiento de enfermedades, habiendo dado lugar al concepto de “dietas individualizadas” y “dietas óptimas” (Corella y Ordovás, 2008; Sánchez-Muniz y Bastida, 2010; Gil, 2013). Se define como Nutrigenética a la ciencia que estudia las diferencias de respuesta a la dieta de unos individuos a otros en virtud de la existencia de variantes genéticas (polimorfismos). Por otro lado se considera a la Nutrigenómica como la ciencia que estudia la interacción de los nutrientes y otras sustancias de los alimentos sobre los genes, modificando la expresión génica y, por tanto, la producción de proteínas con

diferente significado fisiológico (Ordovas y Corella, 2004 Trujillo y cols., 2006; Kaput, 2008; Nus y cols., 2008 (Vaquero, 2008); Corella y Ordovas, 2009; Ferguson, 2009; Sánchez-Muniz y Bastida, 2010; Sánchez-Muniz, F.J. y Bastida, 2010; Simopoulos, 2010; Gil, 2013).

Los componentes de la dieta pueden alterar la expresión génica directa o indirectamente. A nivel celular, los nutrientes pueden: 1) actuar como ligandos para la activación de factores de transcripción que favorezcan la síntesis de receptores; 2) ser metabolizados por rutas metabólicas primarias o secundarias, alterando de ese modo las concentraciones de sustratos o intermediarios; o 3) influir positiva o negativamente sobre las rutas de señalización (Kaput y Rodríguez, 2004) (**Figura 15**)



**Figura 15.** Destino y papel de los nutrientes en las células. Adaptado de Kaput y Rodríguez. (2004) y Martí y cols. (2005).

La progresión desde un fenotipo sano a un fenotipo enfermo puede producirse por cambios en la expresión de diferentes actividades de proteína y enzimas. Dado que los componentes de la dieta son ingeridos regularmente y participan directa e indirectamente en la regulación de la expresión génica, el inicio, la progresión y severidad de una enfermedad pueden estar condicionados por la interacción de los

componentes de la dieta y un grupo de genes (Daniel, 2002; Kaput y Rodríguez, 2004; Ordovas, 2004).

Las dietas desequilibradas inducen remodelación de la cromatina y modificaciones en la metilación del DNA, contribuyendo a la irreversibilidad de los cambios en la expresión génica (Gil, 2013). Por ello, las interacciones del genotipo con la dieta contribuyen a la incidencia y severidad de la obesidad, aterosclerosis, muchos tipos de cánceres, asma y otras enfermedades crónicas (Willett, 2002).

En ese contexto, se destaca la importancia de los compuestos bioactivos de la dieta y una intervención dietética, además de factores ambientales, para la prevención o tratamiento de enfermedades que modelan la expresión génica.

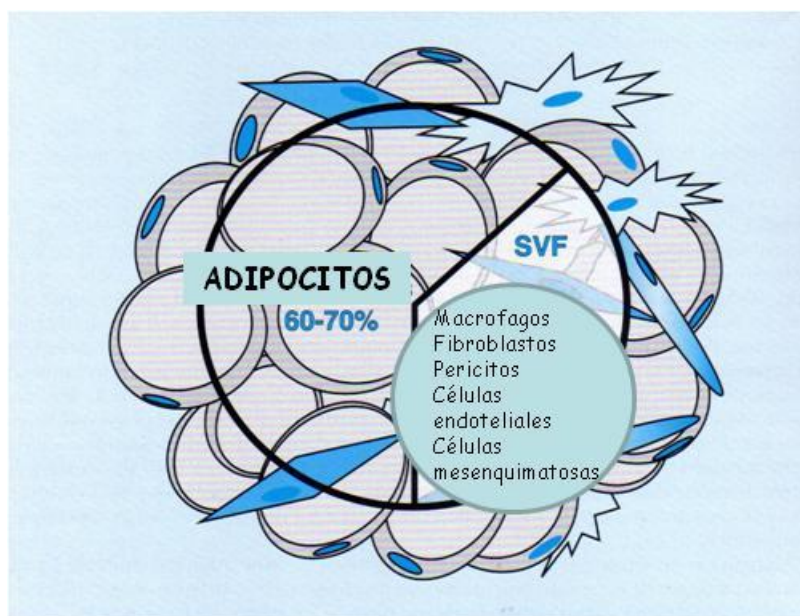
Por ello uno de los objetivos fundamentales de esta tesis fue estudiar el efecto del consumo de cárnicos funcionales conteniendo diferentes algas sobre la expresión génica de diferentes enzimas y metabolitos antioxidantes.

### **1.13. IMPORTANCIA Y FACTORES QUE CONDICIONAN LA LIPOGÉNESIS Y LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO**

El tejido adiposo es un órgano especializado en almacenar energía de forma eficaz, ya que ocupa poco sitio y no demanda agua para su almacenamiento (Frühbeck, 2011). Se han definido dos tipos de tejido adiposo, uno blanco, cuyas células, los adipocitos blancos, se caracterizan por su capacidad de almacenar grasa de forma univacuolar que puede aumentar hasta un tamaño crítico, mientras que los adipocitos marrones o grises presentan en el citoplasma localizaciones de grasa del tipo plurivacuolar. Además de los adipocitos, en el tejido adiposo, existen otras células a las que se han atribuido funciones muy importantes, particularmente macrófagos que permiten la expansión del tejido adiposo y pueden conducir a la resistencia a la insulina (**Figura 16**).

El tejido adiposo marrón tiene una gran importancia en los recién nacidos como órgano metabólico regulando, a modo de “manta eléctrica”, la temperatura de la sangre, que accede al cerebro (Sánchez-Muniz, 2003). Su localización es estratégica a modo de “collareta”, aunque también se localiza alrededor de los riñones, omoplatos, esternón y estructuras torácicas. La regulación de la temperatura de la sangre y, por tanto, de la temperatura corporal la realizan los adipocitos marrones mediante el desacople de la fosforilación oxidativa, donde gran parte de los sustratos metabólicos no se utilizan para almacenar energía en forma de ATP, sino se utilizan para producir calor. El tejido adiposo marrón también participa como un controlador eficaz contra el exceso de

ingesta de energía, promoviendo la termogénesis a través de la modulación de la expresión génica de la termogenina o proteína desacoplante (UCP). Este mecanismo es muy eficaz en los animales jóvenes y en niños y jóvenes, perdiendo eficacia en las personas de edad.



**Figura 16.** Células del tejido adiposo. Nótese, que los adipocitos constituyen del orden del 60-70% de las células del tejido adiposo. Existen también preadipocitos, macrófagos, células endoteliales, pericitos, células mesenquimatosas, etc. que interactúan con el adipocito (Frühbeck, 2011).

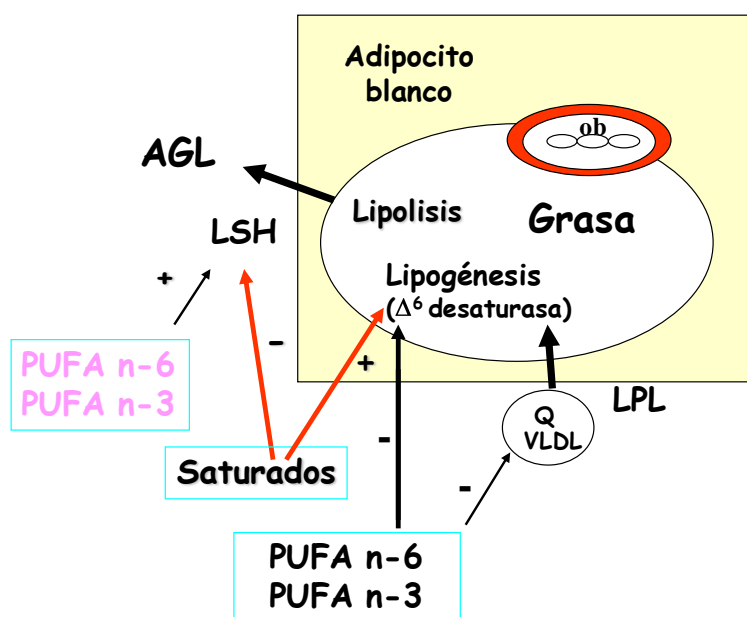
El tejido adiposo blanco tiene diferentes localización corporal, así se han definido adipocitos aislados, otros de localización periférica y otros de localización central (Mahan y Escott–Stump; 2008). La zona corporal donde se almacenan dichas células tiene a su vez gran importancia fisiopatológica; así aquellos adipocitos presentes en la especie humana en la zona abdominal presentan una actividad metabólica elevada y sus componentes tienen acceso fácil, vía porta, al hígado con lo que pueden contribuir de manera más determinante a la resistencia a la insulina mediada por los ácidos grasos libres y la liberación y producción de una elevada cantidad de moléculas activas y citoquinas a través de mecanismos complejos en los que interviene la interacción de los adipocitos con otras células de naturaleza macrofágica (Gil, 2010; Frühbeck, 2011). Por su parte en la grasa de localización inferior o gluteal, se encuentra preferentemente adipocitos cuyos componentes metabólicos tienen mucho menos efectos negativos que los de los adipocitos centrales abdominales, en parte por ser menos susceptibles de



lipólisis y en parte por que sus componentes metabólicos tienen un acceso menos directo al hígado (Gil, 2010; Frühbeck, 2011).

La lipogénesis en el tejido adiposo ha sido estudiada de manera detallada por el grupo del profesor Herrera (Aranda y Herrera, 1974). En presencia de insulina, la LPL endotelial del tejido adiposo activa la degradación de Q y VLDL, permitiendo la cesión de ácidos grasos y glicerol al tejido adiposo. Estos ácidos grasos se utilizan allí para sintetizar TG que se almacenan en el tejido adiposo (**Figuras 7 y 17**). Es decir la LPL tiene un efecto lipogénico en los adipocitos. Cualquier factor que aumente o disminuya la expresión génica de la LPL tendrá incidencia sobre la cantidad de grasa que se almacena en el tejido adiposo. Se ha propuesto que los AGS estimulan la lipogénesis respecto a los AGM y AGP (Sánchez-Muniz, 2003; Sánchez-Muniz y Bastida, 2010).

#### Efectos de diferentes ácidos grasos sobre la lipogénesis y lipólisis



**Figura 17.** Efecto de los ácidos grasos saturados e insaturados sobre la lipogénesis y lipólisis. Fuente: Sánchez-Muniz, FJ. Clases de Nutrición. Facultad de Farmacia, 2013. AGL, ácidos grasos libres; LSH, lipasa sensible a hormonas; LPL, lipoproteína lipasa; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados, Q, quilomicrón, VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

La cantidad de grasa almacenada en las gotas de grasa del tejido adiposo, tiene efectos importantes sobre el comportamiento alimentario, a través de la expresión y síntesis de leptina, la cual actúa sobre receptores cerebrales induciendo una respuesta anorexígena y elevando el gasto de energía, situación que ayuda a evitar la ganancia

excesiva de grasa por el tejido adiposo. En el tejido adiposo existen además procesos por los que se sintetizan ácidos grasos a partir de otros sustratos. La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) mantiene la regulación de los ácidos grasos en el tejido adiposo, mientras que la ácido graso sintasa (FAS) cataliza la síntesis de los ácidos grasos (Nelson y Cox, 2005).

Por su parte en situaciones interprandiales o de ayuno cuando disminuye la concentración de insulina se produce aumento de hormonas lipolíticas que promueven la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo para que pueda ser utilizada por otros tejidos con fines energéticos (p.e. músculo). Entre estas hormonas se encuentran los corticoides, la hormona adrenocorticotropa (ACTH), el glucagón, la hormona de crecimiento (GH). En esta situación postprandial, se produce incremento de la expresión de la lipasa sensible a hormonas (LSH o HSL) que provoca la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol. Ambos sustratos se dirigen hacia el hígado y otros tejidos. En el hígado, la llegada de estos ácidos grasos del tejido adiposo promueve señales muy potentes para sintetizar triglicéridos que se empaquetarán en las VLDL, contribuyendo a modificar la trigliceridemia. También el exceso de ácidos grasos proveniente del tejido adiposo interviene en la formación de cuerpos cetónicos. Por su parte el glicerol que accede al hígado puede contribuir a formar glucosa por vía *de novo*.

Se ha propuesto que los AGM y AGP pueden modular o direccionar de forma favorable la utilización por el músculo de la grasa corporal, elevando la sensibilidad a la insulina. Así, en condiciones normales los AGP y AGM tendrían un efecto mayor sobre la lipólisis que los AGS, evitando el exceso de almacenamiento de los ácidos grasos en los adipocitos y los mecanismos inflamatorios y de índice complejo que induce a largo plazo a obesidad y resistencia a la insulina.

La posibilidad de que el tejido adiposo se constituya además como almacén de colesterol ha sido sugerida por nuestro equipo (Bastida y cols., 2006) ya que ratas alimentadas con dietas enriquecidas en agente hipercolesterolemizante incrementaban en el tejido adiposo su contenido en colesterol de forma que a mayor colesterol en plasma mayor colesterol en tejido adiposo. A este mecanismo puede contribuir la captación forzada de HDL por receptores del tejido adiposo (Nelson y Cox, 2005). Otros autores sugieren que, aunque más elevado, no hay grandes diferencias entre el contenido de colesterol del tejido adiposo en individuos normo e hipercolesterolémicos (Nelson y Cox, 2005). Es interesante señalar que a diferencia del hígado y otros tejidos, un

elevado porcentaje en el tejido adiposo de colesterol (>80%) permanece en forma de colesterol libre. Desconocemos el porqué de esta especialización. En el hígado se ha definido la existencia de “pooles” de colesterol libre y colesterol esterificado que a su vez controlan los niveles de colesterol del plasma a través de modular la expresión génica de receptores de ApoB100-LDL (Dietchy, 1998). Sin embargo, la concentración relativamente baja de colesterol en el tejido adiposo sugiere además de una colesterogénesis no muy importante otros mecanismos que serían importantes estudiar y probablemente resultado de un equilibrio entre captación de HDL del plasma a través de receptores para ApoB100-LDL (Zhou y cols., 2006) y cesión de colesterol en forma de HDL-colesterol vía ATP binding cassette.

## **2. INTERÉS DEL ESTUDIO**

En los últimos años se han producido importantes cambios en los hábitos dietéticos, situación que explica, al menos en parte, el incremento en la incidencia de enfermedades crónicas y degenerativas que está teniendo lugar tanto en los países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo. A pesar de las recomendaciones de la OMS de reducir su consumo en beneficio de alimentos de origen vegetal. El consumo de carne y derivados en la población española es muy elevado. Además, también en los últimos años se ha indicado que algunos constituyentes de la carne pueden influir negativamente en el desarrollo de estas enfermedades degenerativas.

Cada vez se presta más atención hacia aquellos aspectos que mejoran la calidad de vida de los consumidores, lo que está favoreciendo el diseño de nuevos productos para mejorar la salud y prevenir ciertas enfermedades. Habiendo aparecido en el mercado multitud de alimentos llamados funcionales. Entre los ingredientes funcionales de interés destacan las algas por su actividad biológica y beneficios potenciales sobre la salud. Estos vegetales son frecuentemente incluidos como alimento en la dieta de los países asiáticos. Sin embargo, las algas apenas se consumen en los países occidentales. Su incorporación a los alimentos, y en particular a carnes y derivados, favorecería el carácter funcional de los productos cárnicos elaborados, ya que incrementaría o mejoraría su contenido en fibra, ácidos grasos mono y poliinsaturados, minerales, así como de componentes minoritarios que afectan al metabolismo lipoproteico y que presentan ciertas propiedades antioxidantes. En consecuencia, resulta de especial interés su incorporación a productos de amplia aceptación y consumo frecuente como los del sector cárnico.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El consumo de dietas en las que se incluyen cárnicos con conteniendo algas como ingrediente funcional promueve un crecimiento adecuado, protege la morfología y estructura hepática, e induce cambios positivos en el metabolismo lipoproteico en el estatus antioxidante.

Buena parte del desarrollo de nuevos alimentos funcionales está encaminado a mejorar la composición de los alimentos tradicionales y en demostrar que su consumo favorece una o varias funciones del cuerpo y ayuda a disminuir el riesgo de enfermedades degenerativas. Dado que existen muy pocos antecedentes científicos referentes al conocimiento de las propiedades beneficiosas para la salud del consumo de cárnicos conteniendo algas, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es:

Analizar el efecto de productos cárnicos reformulados con la incorporación de diferentes algas sobre parámetros bioquímicos asociados con el riesgo cardiovascular, el estatus antioxidante y la protección hepática frente a hipercolesterolemia.

Esta Tesis Doctoral consta a su vez de los siguientes objetivos más concretos:

- ❖ Cuantificar los efectos del consumo de derivados cárnicos conteniendo algas con diferente composición sobre ingesta, crecimiento, tamaño y estructura de órganos de ratas Wistar en crecimiento.
- ❖ Analizar el impacto del consumo de tales cárnicos sobre lipoproteínas séricas y marcadores de riesgo oxidativo.
- ❖ Estudiar los efectos de los cárnicos con algas sobre la expresión génica y actividad de enzimas antioxidantes.
- ❖ Cuantificar los efectos del consumo sobre la expresión génica en el tejido adiposo de enzimas lipogénicas y lipolíticas.
- ❖ Conocer los efectos del consumo a corto plazo de estos cárnicos sobre crecimiento, colesterolemia y marcadores de apoptosis.
- ❖ Analizar los efectos sobre viabilidad celular e inducción de apoptosis dependientes del estrés oxidativo en cultivos de hepatocitos primarios de ratas alimentadas con estos cárnicos.
- ❖ Estudiar *in vitro* los efectos de diferentes extractos acuosos y orgánicos de las algas sobre la digestión y absorción.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIA PRIMA

Para el desarrollo de los diferentes estudios incluidos en la presente memoria de tesis doctoral se emplearon algas, productos del cerdo (carne y tocino) y diferentes aditivos. Dos algas marrones, Wakame (*Undaria pinnatifida*, familia *Alariaceae*) y Espagueti de mar (*Himanthalia elongata*, familia *Himanthaliaceae*) y un alga roja Nori (*Porphyra umbilicalis*, familia *Bangiaceae*), fueron suministrados por Algamar CB, (Redondela, Pontevedra, España). Las algas marinas habían sido recogidas frescas en la costa atlántica de Galicia, secadas a la sombra y envasadas en bolsas de plástico de polietileno para su distribución comercial.

La carne empleada en esta tesis doctoral junto con el tocino se adquirieron en un centro comercial de Madrid. Ambos procedían del cerdo (*Sus scrofa domestica*), mamífero artiodáctilo de la familia Suidae. Como aditivos se emplearon cloruro de sodio (Panreac Química, S.A. Barcelona, España), tripolifosfato de sodio (Manuel Riesgo, S.A. Madrid, España), nitrito de sodio (Fulka Chemie GmbH, Buchs, Alemania).

Los componentes básicos utilizados en las dietas experimentales fueron obtenidos de DYETS Inc. (Bethlehem, Pennsylvania, Estados Unidos). Otros reactivos y sustancias empleadas se detallan en su apartado específico de la sección “Material y Métodos”.

### 4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE ALGAS

Las algas *Undaria pinnatifida*, *Porphyra umbilicalis*, y *Himanthalia elongata* fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 8 horas y luego liofilizadas. Posteriormente las algas liofilizadas se molieron en un molinillo (Kärcher, Alemania) hasta un tamaño de partícula  $< 10\ \mu\text{m}$ , y se almacenaron a temperatura ambiente ( $20 \pm 2\ ^{\circ}\text{C}$ ) en frascos opacos con tapón de rosca hasta su análisis. Los extractos de algas fueron preparados según en método de infusión de Gray y Flatt (1997) y posterior modificación (Gray y Flatt, 1998). Para la obtención de los diferentes extractos se empleó cloroformo (Sigma–Aldrich, Reino Unido), etanol (95% v/v, Sigma–Aldrich, Reino Unido), y agua destilada.

Alicuotas de 5 mL de los diferentes extractos fueron desecadas a vacío (Savant SPD121P Speed Vac, Labcare, Buckinghamshire, England), y almacenadas a  $-20\ ^{\circ}\text{C}$ .

Justo antes de su uso, las alicuotas desecadas fueron reconstituidas con buffer PBS (0,002 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,14 M NaCl) pH 7,4 a 4 °C.

#### **4.3. ESTUDIOS *IN VITRO* CON EXTRACTOS DE ALGAS**

##### ***a) Actividad de la enzima $\alpha$ -glucosidasa***

La actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, se ensayó como actividad de maltasa, midiendo la producción de glucosa a partir de una solución de maltosa de acuerdo con el método de Mai y cols., (2007). Se utilizaron los extractos a una concentración de 50 g/L. Se utilizó como control positivo acarbosa, un inhibidor de la  $\alpha$ -glucosidasa (Iwai, 2008; Kumar y Sinha, 2012), a una concentración de 1 mg/L en tampón PBS. Las concentraciones resultantes de glucosa se midieron a los 15, 30, 45, 60 y 75 minutos del ensayo en un analizador portátil Microstat P-GM7 (Analox Instruments Inc EE.UU., Lunenburg, MA, EE.UU). La actividad  $\alpha$ -glucosidasa (maltasa) se expresó como mmol/L de glucosa producida por minuto. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

##### ***b) Ensayo de difusión de glucosa in vitro a través de membrana***

Para evaluar los efectos de los diferentes extractos de las algas en la difusión de glucosa *in vitro*, se empleó una adaptación del método de Gallagher y cols. (2003). Se utilizaron los extractos de las algas a una concentración de 25 g/L. El modelo usado en los experimentos consistió en un tubo de diálisis de celulosa de 6 cm x 10 mm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en el que se que se habían incluido 1750  $\mu\text{L}$  de 0,22 M de D-glucosa y 250  $\mu\text{L}$  de 25 g/L de extracto de algas. El tubo de diálisis fue sellado en cada extremo y se colocó dentro de un frasco que contenía 100 mL de 0,9% (w/v) de NaCl. La transferencia de glucosa a través de la membrana de diálisis se midió en la solución salina externa a intervalos de 30 min durante un total de 6 h. Las pruebas control se llevaron a cabo con tampón PBS. Las concentraciones de glucosa se midieron usando un analizador portátil Microstat P-GM7 (Analox Instruments inc, Lunenburg MA, EE.UU.). Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Los cambios en el tiempo de la concentración de glucosa se reflejaron en forma de áreas bajo la curva (AUC) durante 180 minutos y 360 minutos.

#### 4.4. PREPARACIÓN DE LOS REESTRUCTURADOS CÁRNICOS

Para la preparación de los reestructurados cárnicos (RC) se utilizó carne de cerdo, tocino de cerdo y aditivos. En aquellos grupos que contenían algas se adicionó un 15% en materia seca del alga respectiva, mientras que los RC control contenían más cloruro sódico. Aunque los detalles específicos de la preparación han sido señalados por Cofrades y cols. (2008) y López-López y cols. (2009), señalaremos que antes de su incorporación a los RC las algas fueron reducidas a polvo fino en un molino (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Alemania) y se pasaron a través de una malla de 0,25 mm y almacenaron en frascos de plástico a  $4 \pm 2$  °C hasta su uso.

La carne de cerdo (procedente de la mezcla de diferentes músculos: *biceps femoralis*, *semimembranosus*, *semitendinosus*, *gracilis* y *aductor*) fue homogenizada y picada en 1 molinillo (Stephan Universal Machine UM5, Stephan y Söhne GmbH y Co., Hameln, Germany) a 2°C. El tocino de cerdo, las algas (15% concentración final), el NaCl (2,0% en muestras controles y 0,5% en muestras con alga añadida), el tripolifosfato de sodio, y el nitrito de sodio, fueron mezclados hasta homogenidad durante 1 minuto. La mezcla global (carne más los otros componentes) para obtener los RC se homogenizó finalmente durante 1 minuto a vacío durante 1 minuto. Se preparó un duplicado de cada tipo de RC.

La composición de los cárnicos con algas empleadas en esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido previamente descrita por López-López y col. (2009) y se detalla en la **Tablas 7 y 8**.

**Tabla 7.** Componentes (g/100g) empleados en la preparación % de los diferentes reestructurados cárnicos experimentales.

Porcentaje	RC-Control	RC-Wakame	RC-Nori	RC-Espagueti
<b>Carne</b>	59,3	59,3	59,3	59,3
<b>Grasa dorsal</b>	8,1	8,1	8,1	8,1
<b>Alga</b>	0,0	5,6	5,6	5,6
<b>NaCl</b>	2,0	0,5	0,5	0,5
<b>Agua</b>	30,3	26,1	26,1	26,1

RC, reestructurado cárnico. Fuente: López-López y col. (2009).



**Tabla 8.** Composición (g/100g) de los formulados reestructurados cárnicos experimentales.

Porcentaje	RC-Control	RC-Wakame	RC-Nori	RC-Espagueti
<b>Humedad</b>	72,50	71,03	70,57	70,70
<b>Proteína</b>	14,51	14,22	15,75	13,84
<b>Ceniza</b>	3,16	3,28	1,91	3,0
<b>Grasa</b>	9,71	10,29	9,45	10,20

RC, reestructurado cárnico. Fuente: López-López y col. (2009).

#### 4.5. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS

Para su inclusión en las dietas experimentales, los RC fueron previamente liofilizados. Para ello, posteriormente a su obtención, los RC se congelaron a -30°C y se sometieron vacío de 0,03mb durante 48 horas. Posteriormente se aumentó la temperatura hasta 20°C en un liofilizador LyoAlfa 10 freeze dryer (Teltar, Terrassa, Spain).

Se prepararon 8 dietas semi-sintéticas (**Tabla 9**), cuatro de ellas no contenían agentes hipercolesterolemiantes, mientras que a las otras cuatro se añadió dichos agentes. Las cuatro primeras fueron: a) Dieta con RC control (**dieta C**) preparada a partir de 85% de la dieta de roedores AIN-93M 180729 (Purified Rodent Diet, DYETS, Inc. Bethlehem, Pennsylvania, EEUU) mezclada con 15% de RC control liofilizado y 4% de celulosa microcristalina (JRS J. Rettenmaier y Söhne GmbH+Co.KG, Rosenberg, Alemania); b) dieta con RC con Wakame (**dieta W**) preparada a partir de 85% de la dieta de roedores AIN-93M 180729 y 15% del RC con Wakame liofilizado; c) dieta con el RC conteniendo Nori (**dieta N**) preparada a partir de 85% de la dieta de roedores AIN-93M 180729 y 15% del RC con Nori liofilizado, y d) dieta con Espagueti de Mar (**dieta E**) preparada a partir de 85% de la dieta de roedores AIN-93M 180729 y 15% del RC con alga espagueti de Mar liofilizado. Las cuatro dietas con agente hipercolesterolemiantes fueron e) **la dieta ColC** (RC control y colesterol añadido) que se preparó de forma similar a la dieta C, pero en la que se sustituyó en la dieta de roedores AIN-93M 180730, 2,92% de almidón por 2,43% de colesterol y 0,49% de ácido cólico; f) **dieta ColW** (RC con alga Wakame y colesterol), igual a la dieta W pero conteniendo 2,43% de colesterol y 0,49% de ácido cólico; g) **dieta ColN** (RC con alga Nori y colesterol) igual a la dieta N pero enriquecida con 2,43% de colesterol y 0,49% de ácido

cólico; y h) **dieta ColE** (RC con alga Espagueti de Mar y colesterol) igual a la dieta E enriquecida con 2,43% de colesterol y 0,49% de ácido cólico.

Las dietas tenían aproximadamente un contenido de proteína del 20,7%; grasa, 8,7% y 5,4% de fibra.

Ya que el equivalente energético de los monosacáridos es 15,69 kJ/g (3,75 kcal/g); el de los polisacáridos, 16,73 kJ/g (4,0 kcal/g); grasa, 37,65 kJ/g (9,0 kcal/g); proteína, 16,73 kJ/g (4,0 kcal/g); fibra soluble, 8,4 kJ/g (2 kcal/g); el contenido energético de las dietas fue el siguiente: **Dieta C**, 16587,7 kJ/kg (3964,6 kcal/kg); **Dieta W**, 16790,9 kJ/kg (4013,1 kcal/kg); **Dieta N**, 16677,9 kJ/kg (3986,1 kcal/kg); **Dieta E**, 16640,4 kJ/kg (3962 kcal/kg); **Dieta ColC**, 16653 kJ/kg (3965,0 kcal/kg); **Dieta ColW**, 16106,0 kJ/kg (3849,4 kcal/kg); **Dieta ColN**, 16189,9 kJ/kg (3869,5 kcal/kg); **Dieta ColE**, 16153,2 kJ/kg (3846 kcal/kg).

**Tabla 9.** Composición (g/kg) de las dietas experimentales (C, W, N, E, ColC, ColW, ColN y ColE).

	Sin colesterol añadido		Con colesterol añadido	
	C	W, N, E	ColC	ColW, ColN, ColE
Dieta AIN-93M*				
Caseína	127,5	127,5	127,5	127,5
Aceite de soja	34,0	34,0	34,0	34,0
Almidón de maíz	382,75	382,75	353,59	353,59
Dietrosa	131,75	131,75	131,75	131,75
Sacarosa	85,0	85,0	85,0	85,0
Celulosa	42,5	42,5	42,5	42,5
Mezcla mineral <sup>§</sup>	29,75	29,75	29,75	29,75
Mezcla de vitaminas <sup>¶</sup>	12,16	12,16	12,16	12,16
Colesterol			24,31	24,31
Ácido cólico			4,85	4,85
‡Reestructurado cárnico liofilizado (RC)				
‡RC control	150		150	
‡RC con Wakame, Nori o Espagueti de Mar		150		150

\***Otros ingredientes** (g/kg dieta): bitartrato de colina, 3,06 g/kg; L-cistina, 1,53 g/kg; t-butilhidroquinona, 0,0068 g/kg.

<sup>§</sup>**Mezcla de minerales** AIN-93M (unidades): carbonato cálcico, 357,00 g/kg; fosfato potásico monobásico, 250,00 g/kg; citrato potásico H<sub>2</sub>O, 28,00 g/kg; cloruro sódico, 74,00 g/kg; sulfato potásico, 4,60 g/kg; óxido de magnesio, 24,00 g/kg; citrato férrico U.S.P. (United States Pharmacopeia), 6,06 g/kg; carbonato de zinc, 1,65 g/kg; carbonato de manganeso, 0,63 g/kg; carbonato cúprico, 0,30 g/kg; ioduro de potasio, 0,01 g/kg; selenato de sodio, 0,01025 g/kg; paramolibdato amónico 4·H<sub>2</sub>O, 0,00795 g/kg; metasilicato sódico 9·H<sub>2</sub>O, 1,45 g/kg; sulfato de cromo y sulfato 12·H<sub>2</sub>O, 0,275 g/kg; cloruro de litio, 0,0174 g/kg; ácido bórico, 0,0815 g/kg; fluoruro de sodio, 0,0635 g/kg; carbonato de níquel, 0,0318 g/kg; vanadato amónico, 0,0066 g/kg; sacarosa en polvo, 209,806 g/kg.

<sup>¶</sup>**Mezcla de vitaminas** AIN-93VX (unidades): niacina, 3,00 g/kg; pantotenato de calcio, 1,60 g/kg; piridoxina HCl, 0,70 g/kg; tiamina·HCl, 0,60 g/kg; riboflavina, 0,60 g/kg; ácido fólico, 0,20 g/kg; biotina, 0,02 g/kg; acetato de vitamina E (500 IU/g), 15,00 g/kg; vitamina B<sub>12</sub> (0,1 %), 2,50 g/kg; palmitato de vitamina A (150,000 µg retinol/g), 0,80 g/kg; vitamina D<sub>3</sub> (10,000 µg/g), 0,25 g/kg; mezcla de vitamina K<sub>1</sub>/dextrosa (10 mg/g), 7,50 g/kg; sacarosa, 967,23 g/kg.

‡Proteína, grasa, minerales (ceniza) y fibra presentes en 150 g de RC control, RC enriquecido con Wakame, Nori y Espagueti de mar; RC control: 79,15; 52,95; 17,47 y 10 g (celulosa microcristalina), respectivamente; RC enriquecido con Wakame: 73,75; 52,98; 17,14 y 11,95 g, respectivamente; RC enriquecido con Nori: 79,03; 47,82; 9,56 y 10,07 g, respectivamente; RC enriquecido con Espagueti de mar: 69,56; 51,25; 15,05 y 14,12 g.

#### **4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para los estudios incluidos en esta memoria de Tesis Doctoral se utilizaron ratas Wistar macho en crecimiento con un peso aproximado de 90 g procedentes de los laboratorios Harlan (Harlan SL, Barcelona, España). Los animales fueron atendidos conforme a la guía para el Uso y Cuidados de Animales (directiva 86/609/EEC de 24 de noviembre, 1986) modificada por la Directiva Europea 2003/65/CE de 22 de Julio de 2003. Las ratas se distribuyeron individualmente en celdas metabólicas bajo condiciones constantes de humedad (84%) y temperatura ( $22,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ ), con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta y al agua de bebida. Para el estudio a largo plazo de 5 semanas se utilizaron las siguientes dietas: C, W, N, E, ColC, ColW, ColN, ColE. Para el estudio a corto plazo de 1 semana se utilizaron las siguientes dietas: C, ColC, ColW, ColN, ColE.

Durante un periodo de adaptación de una semana a las condiciones ambientales, los animales recibieron pienso estándar (Panlab, Barcelona, España). Posteriormente se distribuyeron en los diferentes grupos experimentales de acuerdo al promedio de su peso corporal. Con la excepción del estudio a corto plazo donde se emplearon grupos de seis ratas cada uno, en el resto de estudios se incluyeron 10 ratas por grupo.

#### **4.7. METODOS ANALÍTICOS**

##### ***4.7.1. Ingesta dietética e índice de eficacia alimentaria***

Durante el periodo experimental, se midió diariamente el consumo de alimento cada animal y se cuantificó en días alternos el peso corporal. El índice de eficacia alimentaria (IEA) se calculó relacionando la ganancia de peso corporal (g) con la ingesta total de alimento (g).

##### ***4.7.2. Obtención de muestras***

Al final del periodo experimental, tras un periodo de ayuno de 14-15 horas, se anestesiaron las ratas, con pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso vivo) por vía intraperitoneal, y se sacrificaron mediante extracción de sangre de la aorta descendente. Las muestras de sangre fueron recolectadas con jeringa heparinizada y posteriormente centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm, recogiendo el plasma.

A continuación, se procedió, rápidamente, a la extracción del hígado, intestino delgado, timo, riñones, tejido adiposo de localización perirrenal y periependimaria, cerebro, bazo, corazón, intestino grueso. Dichos órganos fueron lavados con solución

salina al 0.9%, cuidadosamente secados, pesados y congelados en nitrógeno líquido de forma inmediata, guardándose a -80°C (Thermo electro corporation, modelo 902 rel #2, Ohio, EE. UU.) hasta su análisis. El lóbulo derecho del hígado se conservó en formaldehído al 10% para su análisis histológico posterior.

#### ***4.7.3. Perfil antioxidante***

##### ***4.7.3.a. Determinación de antioxidantes no enzimáticos: Sistema del Glutation***

Para la determinación de la cantidad de glutathion presente en las muestras se empleó el método de Hissin y Hilf (1976), adaptado para placa de 96 pocillos, utilizando como sonda fluorescente el O-ftaldialdehído (OPT). Este método se basa en la capacidad del GSH para reaccionar con el OPT a un pH óptimo de 8, dando lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se activa a una longitud de onda de 350 nm y que presenta un punto máximo de emisión a 420 nm. Por otro lado, la forma oxidada del glutathion reacciona de forma óptica con la sonda fluorescente a un pH= 12. Puesto que a pH > 8 el GSH se transforma en GSSG, será necesario bloquear la forma reducida del glutathion con N-etilmaleimida (NEM) para determinar únicamente el GSSG presente en la muestra biológica y no el resultante de la oxidación del glutathion en presencia de un medio básico.

##### ***4.7.3.b. Índice redox***

El estado redox de un organismo, extracto celular o tisular puede expresarse mediante el índice redox (IR). En esta memoria de Tesis Doctoral se ha definido el IR mediante la fórmula:  $IR = (GSSG / (GSH + GSSG))$ .

##### ***4.7.3.c. Determinación de malondialdehído***

La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó en alícuotas de homogenado de las muestras del hígado en forma de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) según el método de Mihara y Uchiyama (1978). Después de la homogenización de las muestras del hígado con un tampón fosfato (50mM, pH 7,4), se sonicaron los homogenados tres veces con intervalos de 20 segundos, durante 10 segundos cada vez, luego, se centrifugaron durante 20 minutos a 5100 rpm (2300 g) a 4°C. La mezcla de reacción con la alícuota de muestra, se utilizan las siguientes soluciones: ácido fosfórico 1%, TBA 0,6%, y butilado hidroxitolueno (BHT) 0,1%. Se introduce en un baño a

100°C durante 45 minutos, al cabo de este tiempo, se detiene la reacción mediante frío. Se añade alcohol n-butílico, y se agitan para extraer las sustancias reactivas al TBA. Se centrifuga a 5100 rpm (2300 g) durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se recoge la fase orgánica y a partir de esta, se hace la lectura espectrofotométrica a 535 nm.

#### ***4.7.4. Marcadores de daño hepático***

En el plasma se determinaron las enzimas fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1); aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1.), y alanin aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2.) utilizando kit comercial de acuerdo con instrucciones del fabricante en un autoanalizador Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

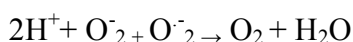
#### ***4.7.5. Concentración de proteínas en el hígado***

Para determinar la concentración total de proteína las muestras se diluyeron 1:100 (v/v) en NaOH 1 N y se valoraron por el método de Bradford (1976) siguiendo el protocolo de referencia del reactivo de Bradford obtenido de Sigma-Aldrich Química S.A. (Missouri, EE. UU.).

#### ***4.7.6. Antioxidantes enzimáticos. Actividad enzimática***

##### ***4.7.6.1. Superóxido dismutasa en hígado***

La enzima superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) es una metaloproteína cuyo lugar de acción es mayoritariamente intracelular. Se distribuye principalmente en mitocondrias y citosol. Dicha enzima actúa eliminando el anión superóxido, mediante el proceso de dismutación que se resume en la ecuación:

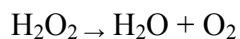


La cuantificación de los niveles de SOD en el hígado, se realiza por la técnica del 1,2,3-bencenotriol o pirogalol (Maklund, 1985), que consiste en la inhibición de la autooxidación de este fenol. Se mide la variación de absorbancia a 420 nm, durante 2 a 3 minutos.

##### ***4.7.6.2. Catalasa hepática***

La enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es abundante en el interior celular. En algunos animales como la rata, se localiza en los peroxisomas, mientras que en otras especies lo hace en el citosol. Es una hemoproteína tetramérica de peso molecular elevado en la que el átomo de hierro realiza el intercambio redox. La actividad de la CAT también

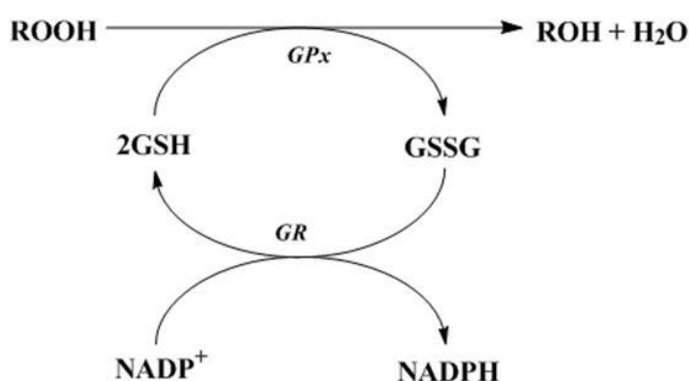
llamada de peróxido de hidrógeno oxidorreductasa se determinó utilizando el método de Aebi (1984). La CAT degrada de forma inmediata el peróxido de hidrógeno formado anteriormente por la SOD o por las oxidasas flavín-dependientes, impidiendo así, la formación del radical hidroxilo. El esquema de la reacción es el siguiente:



La actividad CAT se mide a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno incorporado a las muestras del hígado. Según se degrada el peróxido de hidrógeno, se produce la consecuente liberación de oxígeno. Por tanto, su cinética de descomposición se puede determinar por el seguimiento de la absorbancia a 240 nm durante 60 segundos.

#### 4.7.6.3. *Glutation peroxidasa hepática*

Existen dos tipos de Glutation peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9): la enzima GPx-Se (glutation peroxidasa selenio dependiente) y GPx-no-Se (glutation peroxidasa no selenio dependiente). Para medir ambas enzimas en un solo extracto se utilizó el mismo método, pero variando el hidroperóxido utilizado como sustrato. El ensayo con peróxido de hidrógeno determina exclusivamente la GPx-Se (Paglia y Valentine, 1967), mientras que el ensayo con hidroperóxido de cumeno valora ambas enzimas simultáneamente (GPx total) (Lawrence, 1976). En ambos ensayos se mide la actividad GPx siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH en presencia de un exceso de GR, según la siguiente reacción acoplada:



#### 4.7.6.4. *Glutation reductasa hepática*

La enzima Glutation reductasa (GR) (EC 1.6.4.2) es una enzima capaz de mantener los niveles intracelulares de GSH. Para ello, debe acoplarse al sistema NADPH/NADP<sup>+</sup>. La

actividad enzimática de la GR fue determinada mediante el seguimiento de la oxidación del cofactor NADPH a 340nm, en presencia de un exceso de GSSG (Griffith, 1980). La reacción se siguió durante 4 minutos a partir de 30 segundos de incubación. Se llevó a cabo además, en cada serie de ensayos realizados en el día, una reacción no catalizada en la que se sustituía la muestra por tampón fosfato + EDTA. Mediante esta reacción se cuantificó la oxidación producida espontáneamente, la cual se tuvo en cuenta para los cálculos de la actividad. El blanco se obtuvo con el tampón fosfato + EDTA y la muestra, o solo tampón fosfato + EDTA en el caso de la reacción no catalizada. La reacción se realizó a 25°C.

#### ***4.7.7. Arilesterasa en plasma***

Una de las actividades más importantes de la enzima paraoxonasa-1 (PON1) es la actividad arilesterasa (AE) (Durrington y cols., 2001). Esta enzima cataliza la formación de fenol a partir de acetato de fenilo.

La actividad AE en el plasma de rata se midió de acuerdo con el método de Nus y cols. (2008) que es una modificación de otro propuesto anteriormente (Nus y cols., 2006). Dicho método utiliza como buffer un mimético del suero cuya composición por litro es NaCl, 3,050 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2,268; KCl, 0,224; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,141; HCl, 40 mL; CaCl<sub>2</sub>, 0,278; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,071g; MgCl<sub>2</sub>, 0,305g y Tris csp pH 7,34-7,4 a 37°C. Las reacciones se monitorizaron a 273nm (Eckerson y cols., 1983) en cubetas de cuarzo termostatzado de 1,0 mm de paso de luz, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC (Tokio, Japón). Una unidad de AE se define como la formación de 1 mmol de fenol/min a 37 °C.

#### ***4.7.8. Expresión génica de enzimas antioxidantes y no antioxidantes. Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR)***

Se procedió a la extracción del ARN del hígado mediante una técnica basada en la propiedad única de las moléculas de ARN para mantenerse en solución acuosa formando complejos con el tiocianato de guanidina. Del tejido hepático se tomaron 100-150 mg y se añadieron 4,4 mL de RNazol (preparado con solución D: tiocianato de guanidina, mercaptoetanol 14M, citrato sódico 0,75M y sarcosil al 20% + fenol saturado pH 7, acetato sódico 2M pH 7). Este reactivo produce la lisis celular. Todo el material involucrado en este proceso fue tratado con H<sub>2</sub>O-DPC (agua destilada tratada con dietilpirocarbonato + etanol).



Las muestras se dejaron en hielo durante 15 min y se homogenizaron en un homogenizador de teflón (Wheaton instruments, Millville, EE.UU.) A continuación se añaden 100 µl de CHISAN (preparado mezclando cloroformo con ácido isoamílico (3metil-1-butanol) (48:2)) por cada mL de homogenado. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos para solubilizar el ARN, se deja 15 minutos a 4°C y posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. De este modo se obtienen dos fases bien diferenciadas. La fase inferior (orgánica) contiene el ADN, mientras que en la fase superior (acuosa) se encuentra el ARN soluble. Ambas fases se encuentran separadas por una interfase opaca de naturaleza proteica. La fase superior se pasa a otro tubo donde se precipita el ARN con un volumen igual de isopropanol, se mezcla bien y se mantiene 2 horas a -20°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugan a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C y el precipitado de ARN se lava dos veces con etanol al 75% (v/v).

Para valorar la concentración y pureza del ARN se eliminó el etanol, resuspendiéndose el precipitado en EDTA 1 mM pH 7 en agua DPC, midiéndose la absorbancia a 260, 280 y 310 nm. Los valores de estas absorbancias se corresponden a la concentración de ácido nucleico, proteínas e impurezas, respectivamente. La relación entre A260/A280 es un índice del grado de contaminación por proteínas de la muestra y se considera correcto si está comprendido entre 1,9 y 2. La valoración cuantitativa de los ácidos nucleicos aislados se realizó teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde con 50 µg/mL de ADN de doble hélice y con 40 µg/mL de ARN y ADN de cadena sencilla.

La RT-PCR permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de ARN (tanto ARNm como ARN total) con gran especificidad. Realiza una transcripción reversa del ARN a ADNc que se amplía posteriormente. Para realizar este análisis se utilizó el Kit “*Titan One tube RT-PCR System*” (Roche, Barcelona, España). Las disoluciones y los tampones que se utilizaron fueron los siguientes: Tris-HCl pH 9,0 75 mM; KCl, 50 mM; disolución de nucleótidos conteniendo cuatro desoxinucleótidos fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración de 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM.

Se añadieron 24 µL de Master Mix 1 y 25 µL de Master Mix 2 a 1 µL de ARN de cada muestra en tubos de PCR de 0,2 mL mantenidos en hielo. El Master mix 1 es una mezcla de desoxinucleótidos (dNTP), oligonucleotidos, ditiotreitól (DTT) y agua desionizada estéril pre-refrigerada. El Master Mix 2 consistió en tampón de RT-PCR

(MgCl<sub>2</sub> y DMSO), mezcla de enzimas (AMV transcriptasa inversa, ADN polimerasa Taq), y agua desionizada estéril pre-refrigerada. Esta mezcla final se agitó y se centrifugó brevemente para recoger la muestra en la parte inferior del tubo, y se realizó la RT a 50 °C durante 30 min. Se utilizó la  $\beta$ -Actina cADN como control interno. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,8% que contenían bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL) junto a un marcador de ADN de peso molecular de 100 bp (Genscript corporation, Piscataway, EEUU). Los productos fueron cuantificados por densitometría láser.

Los oligonucleótidos empleados a una concentración de 70  $\mu$ M con una elongación final a 72° C durante 10 minutos, se muestran en la **tabla 10**.

#### ***4.7.9. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)***

A partir de 100 mg de una mezcla homogénea de tejido adiposo perirrenal y periepididimario se aísla ARNtotal utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se trataron a continuación con el kit de ADN libre<sup>TM</sup>, tratamiento con DNasa, y reactivos para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El rendimiento y la calidad del ARN se evaluó midiendo la absorbancia a 260, 270, 280, y 310 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 1,3%. 1,5 g de ARN total de cada muestra se transcribió de forma inversa a la primera hebra ADN complementario (ADNc) utilizando el kit de síntesis de DNAc iScript<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Los niveles de ARNm de FAS, ACC, HSL, y de LPL se cuantificaron mediante PCR en tiempo real con un termociclador iCycler<sup>TM</sup> - MyiQ<sup>TM</sup> Tiempo real Sistema de Detección de PCR (Bio-Rad, Madrid, España), y una sonda TaqMan para FAS y SYBR Green para ACC, HSL, y LPL. El ARNm de la  $\beta$ -Actina sirvió como marcador de referencia y se midió paralelamente y en las mismas condiciones experimentales que las demás muestras.

**Tabla 10.** Detalles de las técnicas de RT-PCR empleadas

<i>Primers</i>	Secuencia	Temperatura/Tiempos/Ciclos de la PCR	Producto
CAT	5' GTGAGAACATTGCCAACCAC 3' 5' CTCGGGAAATGTCATCAAAAG 3'	94-55-72°C/30-45-30s/30c	395 bp
Mn-SOD	5' GACAAACCTGAGCCCTAAGGG 3' 5' CTTCTTGCAAACCTATG 3'	95-52-72°C/30-60-30s/27c	361 bp
Cu,Zn-SOD	5' GCCGTGTGCGTGCTGAA 3' 5' TGACGATGCCGTGCTGCATG 3'	94-55-72°C/30-45-30s/30c	383 bp
GPx	5' CCAATCAGTTCGGACACCAG 3' 5' AAAGTTCCAGGCAATGTCGT 3'	94-60-72° C/60-60-60s/30c	260bp
GR	5' TCACTGCTCCGCACATCC 3' 5' CTCAACACCGCCAGCGTTCTCC 3'	94°C/3min/94-54-72° C/30-30-90s/34c	296bp
CYP7A1	5'CACCATTCTGCAACCTT 3' 5'GTACCGGCAGGTCATTCA 3'	95-60-72 °C/30-30-30 s /40c	170bp
CYP4A1	5' CTCTTACTTCGGAGAATGGAGAA 3' 5' GACTTGGATACCCTTGGGTAAAG 3'	95-60-72 °C/60-60-60 s/30c	351 bp
β-Actina	5'TACAACCTCCTTGCAGCTCC 3' 5'GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC 3'	94-58-72 °C/30-45-30 s/24c	630bp

Se indica la temperatura y el tiempo empleado en las fases de desnaturalización, templado, extensión de la PCR, seguidas del número de ciclos.

Para FAS y  $\beta$ -Actina, se añadió 1  $\mu$ L de cada ADNc a la mezcla de reactivos de PCR, Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Takara, Madison, Wisc., EE.UU.), con cebadores “upstream” (200 nm FAS y 200 nm  $\beta$ -Actina) y “downstream” (200 nm FAS y 200 nm  $\beta$ -Actina), así como la sonda (2,5  $\mu$ M de FAS y 0,5  $\mu$ M de  $\beta$ -Actina). Se diseñaron “primers” específicos (GenBank: FAS, NM-007988;  $\beta$ -Actina, AJ312092) que se adquirieron comercialmente (Eurogentec, Lieja, Bélgica). Sus secuencias nucleotídicas fueron:

FAS sentido: 5'CAGCGTATCACCTCTTGCATGG3';

FAS antisentido: 5'CCTGCTAGGTCCCGGATACC3';

5'FAM-TGCCACGGCCTT CACCAGATCCCT-BHQ-3' (Sonda);

$\beta$ -Actina sentido: 5' TCTATGAGGGCTACGCTCTCC-3'

$\beta$ -Actina antisentido: 5' CACGCTCGGTCA-GGATCTTC-3';

5'-FAM-CCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC-BHQ-3' (Sonda).

Los parámetros de PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 95° C durante 5 seg seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 5 seg y templado y extensión combinados a 60 ° C durante 60 seg para FAS y 30 seg para  $\beta$ -Actina.

Los niveles de mRNA de la ACC, HSL, y de la LPL,  $\beta$ -Actina se midieron también con SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix para normalizar los resultados. Se añadieron 0,1  $\mu$ L de cada ADNc al reactivo de mezcla de la PCR, SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems), con los cebadores “upstream” y “downstream” (600 nM para cada ACC, 300 nM para cada HSL y  $\beta$ -Actina, y 900 nM forward primers y 600 nM primers reversos para LPL). Los primers específicos (GenBank: HSL, NM 010719, LPL, AF356087; ACC, AF356089;  $\beta$ -actina AJ312092) fueron sintetizados comercialmente (TIB Molbiol, Berlín, Alemania), y las secuencias fueron:

HSL sentido: 5' GGTGACACTCGCAGAAGACAATA 3';

HSL antisentido: 5' GCCGCCGTGCTGTCTCT 3';

LPL sentido: 5'CAGCTGGGCCTAACTTTGAG 3';

LPL antisentido: 5' CCTCTCTGCAATCACACGAA 3';

ACC sentido: 5' GGACCACTGCATGGAATGTAA 3';

ACC antisentido: 5' TGAGTGACTGCCGAAACATCTC 3';

$\beta$ -Actina sentido: 5' ACGAGGCCAGAGCAAGAG 3';

$\beta$ -Actina antisentido: 5' GGTGTGGTGCCAGATCTTCTC 3'.

La reacción de PCR fue iniciada con una incubación de 2 minutos a 50° C, seguida de la desnaturalización a 95° C durante 10 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 seg, templado a 62,7° C para ACC, 60° C para HSL y  $\beta$ -Actina, y a 60,4° C durante 30 seg para la LPL, y extensión a 60° C durante 30 seg. Los niveles de todas las muestras de mRNA fueron normalizados a los valores de  $\beta$ -Actina.

Para el análisis de la expresión de genes se utilizó el método de ddCt (Livak y Schmittgen, 2001), Siendo el  $C_t$  es el valor obtenido de las reacciones de PCR en tiempo real. Con los valores de  $C_t$  se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica:

$$\text{Exp} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tm} - \Delta C_{tcb}$$

Donde el  $\Delta C_{tm}$  es el valor de  $\Delta C_t$  de las muestras a ser evaluadas; y el  $\Delta C_{tcb}$  es el valor de  $\Delta C_t$  de la muestra calibradora (gen calibrador: referencia). Una vez que los valores de  $C_t$  fueron calculados, dada la naturaleza exponencial de la curva de PCR en tiempo real, se hizo una corrección logarítmica para minimizar la varianza de los valores.

#### **4.7.10. Lípidos y lipoproteínas**

##### **4.7.10.1. Determinación de lípidos en plasma y lipoproteínas**

Los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en plasma y lipoproteínas se determinaron utilizando métodos enzimáticos colorimétricos estándar (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). Todos los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron <5,5%.

**4.7.10.2. Aislamiento y determinación de lipoproteínas.** Para el aislamiento de las lipoproteínas, las muestras de plasma se mantuvieron refrigeradas a 4°C. Las fracciones lipoproteicas (VLDL, IDL+LDL y HDL), se separaron del plasma mediante ultracentrifugación por gradiente de densidad. Se utilizaron tubos ultraclear (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Se calibraron los tubos, marcando volúmenes cada 1 mL, señalando además el nivel para cada gradiente de densidad y el lugar donde los tubos serían posteriormente cortados. Se mezcló 1 mL de plasma con 114 mg de KBr y 25 mg de sacarosa. Posteriormente se añadió cuidadosamente 2,4 mL de la solución salina, y 2,4 mL de agua destilada siguiendo el método de Terpstra y cols. (1981) pero sin preteñir las lipoproteínas como señalan Sánchez-Muniz y cols. (2003) y Bocanegra y cols.

(2010). Las fracciones lipoproteicas se obtuvieron por aspiración tras corte de los tubos en el rango de densidad de VLDL ( $\rho_{20} < 1,0063$  g/mL), LDL ( $1,0063 < \rho_{20} < 1,057$  g/mL) y HDL ( $1,057$  g/mL  $< \rho_{20} < 1,21$  g/mL) después de 7h a 50,000 rpm (232,000 g) a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-70M, con rotor SW-50.1 (Palo Alto, CA, EE.UU).

#### **4.7.10.3. Extracción grasa del tejido adiposo y del tejido hepático**

Se determinó el contenido de grasa del tejido adiposo y del hígado mediante gravimetría, tras la extracción con cloroformo/metanol de la grasa por el método de Folch y cols. (1957).

#### **4.7.10.4. Determinación del colesterol en el hígado**

Los extractos lipídicos del tejido hepático se disolvieron en isopropanol (95% v/v). En dichas disoluciones se determinó el contenido de colesterol total por el método enzimático colorimétrico de SPINREACT (kit # 1001090) (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain). La turbidez, cuando estuvo presente en algunas muestras, se eliminó mediante centrifugación a 2,200 g durante 5 minutos a 4°C, una vez desarrollada la reacción enzimática colorimétrica y antes de la lectura espectrofotométrica según indican Viejo (1992) y Viejo y cols. (2003).

#### **4.7.11. Estudio histológico**

Las muestras del lóbulo principal del hígado fueron fijadas inicialmente en formol tamponado al 10%, posteriormente en xilol y luego con soluciones alcohólicas de graduación creciente. Los tejidos ya deshidratados se incluyeron en un bloque de parafina para obtener secciones de cada muestra en el micrótopo (JUNG RM 2155, Leica®, Solms, Alemania). Las secciones de 5 µm de espesor se sometieron a la acción de la hematoxilina y de la eosina. El estudio histológico se realizó en 3 secciones de cada hígado amplificando 4x, 10x y 20x, mediante un fotomicroscopio digital (Olympus BX50, Tokyo, Japón) con cámara DP50 integrada (Olympus BX50, Tokyo, Japón).

Para cuantificar el número de agregados linfoides portales y parénquimatosos, las necrosis por coagulación, los focos necro-inflamatorios, la inflamación periportal, las mitosis, apoptosis, número de focos hemorrágicos, quistes grasos y células multinucleadas, se observaron 10 campos de cada preparación a 40x. El grado de degeneración hidrópica, vacuolar y grasa se puntuó de la siguiente manera: 1=0-10%, 2=10-30%, 3=30-60%, 4=50-80%, 5=80-100%. Las necrosis de células individuales, los

focos necro-inflamatorios y la infiltración con células inflamatorias, y la presencia de megalocitos se puntuó de la siguiente manera: 1=leve; 2=moderado; 3=intenso; 4=severo. Para el tipo vacuolas la puntuación fue: 1=multivacuolar; 2=multivacuolar con alguna univacuolar.

#### **4.7. 12. Aislamiento de hepatocitos**

De igual forma a lo señalado en el estudio a largo plazo, para evitar diferencias en el tiempo de análisis entre lotes se seleccionó al azar un animal por vez de los 5 grupos experimentales. Se anestesiaron las ratas con pentobarbital sódico y se prepararon para perfusión hepática y aislado de los hepatocitos mediante la técnica de perfusión con colagenasa previamente descrita por (Seglen, 1993). La viabilidad de los hepatocitos aislados se evaluó mediante el ensayo de tinción con el colorante Azul de tripán previamente descrito por (Diez-Fernandez y cols., 1996). En todos los casos se encontró una viabilidad en los hepatocitos >90%.

#### **4.7.13. Contenido de ADN y evaluación del ciclo celular**

Hepatocitos viables  $10^6$  fueron teñidos con yoduro de propidio siguiendo el procedimiento de múltiples pasos de Vindelov y cols. (1983). La emisión de fluorescencia del complejo ADN- yoduro de propidio se midió en un citómetro flujo FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, California, EE. UU.) en el canal FL2-A. Se utilizó un módulo discriminador para diferenciar entre las señales procedentes de un solo núcleo y aquellos producidos por la agregación nuclear. El análisis de datos se realizó mediante la evaluación de las entradas individuales ( $10^4$  núcleos / ensayo) y se expresó como el porcentaje de la distribución de ADN en las distintas fases del ciclo celular de la población diploide G0 / G1 (2C), la población S<sup>1</sup> (2C → 4C), G2 + M población tetraploide (4C). El índice de ADN utilizando el grupo C como control se calculó a partir de la media población diploide G0G1 del grupo reestructurado cárnico con algas y colesterol dividido por la media población diploide G0G1 del grupo C. Para calcular el índice de ADN utilizando el grupo ColC como control la media población diploide G0G1 del grupo reestructurado cárnico con algas y colesterol se dividió por la media población diploide G0G1 del grupo ColC.

**4.7.14. Actividad de la caspasa-3**

La actividad de la caspasa en los hepatocitos se utilizó como marcador de apoptosis celular. La actividad caspasa-3 se evaluó por triplicado siguiendo el método fluorimétrico de Bijur y cols., (2000), con ligeras modificaciones como fue el empleo de placas de 96 pocillos de fondo transparente. En cada pocillo se incluyeron 100  $\mu$ L del buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10% glicerol, 10 mM ditioneitol), el sustrato caspasa-3 (AC-DEVD-AMC) a una concentración final de 20  $\mu$ M. Se lisaron los hepatocitos con 100  $\mu$ L de buffer de lisis, se agitaron en vortex por 30 minutos y centrifugaron a 13,000 g por 5 minutos a 4°C. Las concentraciones de proteínas en los sobrenadantes se determinaron según el método de Bradford (1976). El extracto celular (20  $\mu$ g proteína) ha sido añadido para empezar la reacción. La fluorescencia se midió en un lector de placas a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión, después de 1 hora de incubación a 37°C. La actividad de la caspasa-3 se calculó mediante la siguiente fórmula

$$[(\text{media de la fluorescencia AMC de los pocillos en triplicado}) - (\text{fluorescencia basal})] / \mu\text{g proteína.}$$
**4.7.15. Valoración de la apoptosis: citocromo c**

Las muestras de tejido fueron homogenizadas por 5 minutos en buffer PBS en la fracción de 100 mg tejido/0.5 mL PBS. Los homogenizados se colocaron en hielo y centrifugaron a 12,000 g durante 30 minutos. Para estandarizar las determinaciones por Western blot se analizaron muestras que contenían 40  $\mu$ g de proteína. Brevemente, las proteínas fueron separadas por 12 % SDS-PAGE y transferidas sobre membranas PVDF (Millipore, Belford, NJ, EE.UU.). Las membranas fueron bloqueadas utilizando el buffer PBS-T conteniendo 0,1% Tween 20 durante al menos 1 hora con el anticuerpo primario en la solución anterior en un agitador orbital a 4 °C durante la noche. La incubación fue seguida por lavado con PBS y fue incubado con el anticuerpo secundario (anti-conejo) en la dilución de 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó como control  $\beta$ -Actina (Santa Cruz, CA, EE.UU.).

**4.7.16. Método estadístico**

Se determinó la normalidad de distribución de los datos mediante el test de Kormogorov-Smirnov. Los resultados se expresaron como los valores medios y su



desviación estándar. Las diferencias fueron aceptadas como significativas para valores de  $p < 0,05$ . Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (versión 15.0).

Se aplicó posteriormente un test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para analizar los efectos del colesterol y de las algas sobre los resultados. Cuando se encontró interacción significativa entre el colesterol y el alga, el efecto del alga se estudió separadamente en las dietas sin colesterol (C, W, N y S) y en aquellas con colesterol (ColC, ColW, ColN y ColS) mediante el test de ANOVA de una vía seguido de la corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni. El efecto del consumo de colesterol (dietas Col vs. sus correspondientes dietas sin colesterol) se estudió mediante el test de la  $t$  de Student. Los resultados del estudio histológico se compararon utilizando el método de la significación exacta bilateral de MonteCarlo. Seguidamente, los grupos fueron comparados con sus parejas usando el test estadístico exacto de Fisher.

Se empleó el test de correlaciones producto-momento de Pearson para conocer las posibles correlaciones lineales entre parámetros.

Se aplicó el análisis multivariante de componentes principales (PCA) para estudiar la influencia de extractos de algas sobre la digestión con maltasa y transferencia de glucosa para reducir la información a un número reducido de componentes principales en términos del porcentaje del total de la varianza de la muestra explicada, seleccionando aquellos valores con “eigenvalues”  $> 1,0$ . Para obtener el peso esperado para cada factor de extracción, se rotaron posteriormente los valores mediante el método Varimax También se realizó una representación gráfica del PCA con el fin de informar de forma gráfica qué los parámetros informaban con mayor precisión del porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa y cuáles de la difusión de la glucosa.

## 5. EXPOSICIÓN DE RESULTADOS/PUBLICACIONES

Los resultados más relevantes de esta Tesis Doctoral se han publicado en revistas indexadas en el Journal citation report. Sin embargo, también se presentan otros resultados aun no publicados o pendientes de ser enviados para su publicación. Para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral se han estudiado por un lado los efectos a medio-largo y corto plazo en ratas Wistar macho en crecimiento del consumo de dietas, obtenidas modificando la dieta AIN-93M mediante la adición de cárnicos reestructurados enriquecidos con algas (Wakame, Nori o Espagueti de Mar) y con adición o no de colesterol/ácido cólico sobre diferentes aspectos nutricionales, estructurales y metabólicos. Por otro lado, se ha estudiado los efectos *in vitro* de extractos de algas sobre dos etapas de la digestión y absorción de hidratos de carbono.

A medio-largo plazo se evaluaron los efectos del consumo de dietas con o sin colesterol añadido conteniendo reestructurados cárnicos enriquecidos en algas sobre:

- a) la ingesta dietética, crecimiento e índice de eficiencia alimentaria (IEA);
- b) los niveles de lípidos en plasma y lipoproteínas;
- c) la defensa antioxidante plasmática y hepática estudiando el estatus del glutathione, los niveles de TBARS, AE, la actividad y niveles expresión génica de enzimas antioxidantes hepáticos;
- d) la expresión génica de enzimas lipogénicos y lipolíticos del tejido adiposo;
- e) marcadores de daño hepático y estructura del hígado y otros tejidos mediante análisis histológico.

A corto plazo durante una semana, se analizó sobre el plasma el colesterol y los hígados de las ratas los efectos de dietas hipercolesterolemiantes conteniendo reestructurados cárnicos con algas. Se evaluaron los efectos sobre el ciclo celular, la apoptosis y la expresión del citocromo C.

### 5.1. PUBLICACIÓN N° 1.

**British Journal of Nutrition** (2011), 106, 1476–1486. **ISI Web. JCR. (2011).** Índice impacto: 3.013 (19 de 74 en Nutrition & Dietetics)

**Efectos de carnes enriquecidas con Nori y Wakame con o sin colesterol añadido en la actividad de la arilesterasa, lipemia y lipoproteínaemia en ratas Wistar en crecimiento**

Raúl Olivero-David; Adriana Schultz Moreira; Miguel Vázquez-Velasco; Laura González-Torres; Sara Bastida; Juana Benedí; María Isabel Sanchez-Reus; María José González-Muñoz; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Algunas algas ejercen propiedades antioxidantes y hipocolesterolemiantes. Se testaron los efectos de las dietas a base de reestructurados cárnicos (RC) que contienen las algas Wakame (W) o Nori (N) en la actividad de la arilesterasa (AE), concentración y composición de las lipoproteínas. Se estudiaron seis grupos de diez ratas Wistar macho en crecimiento cada uno, que fueron alimentadas durante 35 días con una mezcla de 85% de dieta AIN-93M y 15% de RC. El grupo control (C) consumió RC control, los grupos W y N consumieron RC con 5% de W y 5% de N, respectivamente. Los grupos enriquecidos con colesterol, C enriquecido en colesterol (CC), W enriquecido en colesterol (CW) y N enriquecido en colesterol (CN) consumieron sus dietas basales correspondientes que tenían colesterol adicional (2,43%) y ácido cólico (0,49%). El colesterol en la dieta produjo menor índice de crecimiento ( $p < 0,001$ ). Las dietas W y N incrementaron significativamente la actividad AE. Los valores de VLDL-colesterol fueron más bajos en las ratas N que las W. La actividad de la AE se incrementó ( $p < 0,001$ ) en CC y CW ratas pero no en las ratas CN en comparación con sus basales sin colesterol. La actividad AE fue menor ( $p < 0,05$ ) en el grupo CN que en los grupos CC y CW. La dieta CN parcialmente bloqueó ( $p < 0,001$ ) la inducción de hipercolesterolemia observada en las dietas CC y CW y produjo menores niveles de triglicéridos (al menos  $p < 0,05$ ) con respecto a las ratas CC. Aunque la suplementación dietética con colesterol aumentó el colesterol total, VLDL-colesterol y colesterol transportado por las lipoproteínas de densidad intermedia + LDL (todos  $p < 0,001$ ) en todas las dietas, la dieta CN mejoró moderadamente el perfil de lipoproteínas. Los cambios en la actividad de la AE y colesterol en plasma en ratas CN, pero no en las CW sugieren una posible relación entre los dos parámetros. Se concluye que la inclusión de RC enriquecidos con N en dietas hipercolesterolemiantes puede ser útil para mejorar el metabolismo lipoproteico.

## Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats

Raúl Olivero-David<sup>1,2</sup>, Adriana Schultz-Moreira<sup>2</sup>, Miguel Vázquez-Velasco<sup>2</sup>, Laura González-Torres<sup>2</sup>, Sara Bastida<sup>2</sup>, Juana Benedí<sup>3</sup>, María Isabel Sanchez-Reus<sup>4</sup>, María José González-Muñoz<sup>1</sup> and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, E-28871 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

(Received 29 October 2010 – Revised 14 March 2011 – Accepted 17 March 2011 – First published online 3 June 2011)

### Abstract

Some seaweeds exert antioxidant and hypocholesterolaemic properties. The effects of diets including restructured meats (RM) containing Wakame (W) or Nori (N) algae on arylesterase (AE) activity and lipoprotein concentration and composition were tested. In the present study, six groups of ten male growing Wistar rats each were fed a mix of 85% AIN-93M diet and 15% freeze-dried RM for 35 d. The control group (C) consumed control RM, the W and N groups consumed RM with 5% W and 5% N, respectively. The cholesterol-enriched C (CC), W (CW) and N (CN) groups consumed their corresponding basal diets with supplementary cholesterol (2.43%) and cholic acid (0.49%). Cholesterol in the diet induced lower ( $P<0.001$ ) growth ratios. Both W and N diets significantly increased AE activity. VLDL-cholesterol values were lower in N rats than in W rats. AE activity increased ( $P<0.001$ ) in CC and CW rats but not in CN rats compared with their corresponding counterparts. AE was lower ( $P<0.05$ ) in the CN group than in the CC and CW groups. The CN diet partially blocked ( $P<0.001$ ) the hypercholesterolaemic induction observed in CC and CW diets and reduced TAG levels (at least  $P<0.05$ ) with respect to those of CC rats. Although dietary cholesterol supplementation increased total cholesterol, VLDL-cholesterol and (intermediate-density lipoprotein + LDL)-cholesterol (all  $P<0.001$ ) in all rats, the CN diet moderately improved the lipoprotein profile of hypercholesterolaemic rats. Changes in AE activity and plasma cholesterol in CN rats but not in CW rats suggest a possible relationship between the two parameters. It is concluded that inclusion of RM enriched with N may be used in hypercholesterolaemic diets to improve lipoprotein metabolism.

**Key words:** Nori; Wakame; Functional meats; Dietary cholesterol; Arylesterase; Lipids; Lipoproteins

Meat and meat products, which concentrate and supply a large number of valuable nutrients (proteins, fats, vitamins and minerals), have traditionally been basic components of the human diet. However, epidemiological associations between consumption of meat and meat derivatives and some of the major degenerative diseases such as CHD, cancer, high blood pressure and obesity have influenced nutritional thinking and dietary guidelines over the last few years<sup>(1)</sup>. At present, the meat industry is introducing qualitative and/or quantitative modifications in meat and meat derivatives to create functional products<sup>(1,2)</sup>.

Functional foods can be obtained by combining products such as meat products with physiologically active substances (e.g. from plants). Marine algae, traditional components of the Asian diet whose consumption in the Western world has increased considerably over the last decade, are known to contain such substances<sup>(3)</sup>. Some species of *Undaria* and *Porphyra* contain high levels of fibre, several minerals and vitamins, and their lipid content is normally  $<1.0\%$ . Furthermore, it has been reported that these algae contain several minor compounds with beneficial biological activities<sup>(4)</sup>.

**Abbreviations:** AE, arylesterase; C, control; CC, cholesterol-enriched control; CN, cholesterol-enriched Nori; CW, cholesterol-enriched Wakame; IDL, intermediate-density lipoprotein; N, Nori; RM, restructured meat; W, Wakame.

\* **Corresponding author:** Professor F. J. Sánchez-Muniz, fax +34 91 3941810, email frasan@farm.ucm.es

Hypercholesterolaemia is associated with increased oxidative stress in animals<sup>(5)</sup> and humans<sup>(6)</sup>. Increased dietary intake of antioxidants may thus reduce the incidence and prevalence of CHD and other degenerative diseases<sup>(7)</sup>. Our group has tested the effects of diets containing supplements of Nori (N) and Konbu<sup>(8)</sup> and those of N- and Wakame (W)-enriched meat products<sup>(9)</sup> on the antioxidant status of Wistar rats consuming high levels of cholesterol. It is well known that certain modifications of the lipoprotein profile increase the risk of developing atherosclerosis<sup>(10–13)</sup>. Moreover, increased lipoprotein oxidation constitutes one of the major emerging risk factors for atherosclerosis<sup>(14)</sup>. Arylesterase (AE), one of the enzymatic activities of paraoxonase-1<sup>(15)</sup>, is known to play a protective role against peroxidation of LDL and other lipoproteins<sup>(15–18)</sup>. However, the effect on the lipoprotein profile of diets containing a high percentage of meat and seaweeds, with or without supplementary cholesterol, has not been studied previously. The inclusion of alga in restructured meat (RM) could have a double-edged effect, as both meat and seaweeds are rich in Fe and high levels of this metal are known to increase oxidative stress<sup>(19)</sup>. Due to the growing demand for alternative treatments for CHD, the present study aimed to investigate the effects of 5-week-long cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched diets that included restructured pork containing W or N on AE activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats.

In the present study, we hypothesise that certain seaweeds added to meat derivatives reduce the hypercholesterolaemic effect of cholesterol-enriched diets, partially normalising the lipoprotein profile. Moreover, alga-enriched meat increases AE activity, helping to maintain the antioxidant status of lipoproteins in rats fed diets that contain hypercholesterolaemic inductors.

## Materials and methods

### Restructured meat preparation

Meat raw materials (post-rigor pork and pork back fat), W (*Undaria pinnatifida*) and N (*Porphyra umbilicalis*) algae, and additives (NaCl, sodium tripolyphosphate and sodium nitrite) were used. Fresh marine seaweeds were collected on the Atlantic coast, dried in the shade and packed in polyethylene plastic bags for commercial

distribution (Algamar C.B., Redondela, Pontevedra, Spain). These seaweeds were milled (Ultra Centrifugal Mill ZM 200; Retsch GmbH and Company, KG, Haan, Germany), passed through a 0.25 mm mesh sieve and stored in plastic flasks at  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  until used. Details of the RM preparation and composition have been published previously<sup>(2)</sup>. In brief, the raw meat was homogenised and ground for 1 min in a chilled cutter ( $2^\circ\text{C}$ ; Stephan Universal Machine UM5; Stephan & Söhne GmbH and Company, Stephanplatz, Hameln, Germany). All the fat and half of the seaweeds, NaCl (2.0% for control samples and 0.5% for samples with added seaweed), sodium tripolyphosphate and sodium nitrite were added to the ground meat and mixed together for 1 min; the rest of the ingredients were then added, and the mixture was homogenised for 1 min. The final mixture was homogenised under vacuum for 2 min. Each sample was prepared in duplicate. RM-N and RM-W contained less Na than RM-C (385.5, 626.7 and 873.8 mg/100 g RM, respectively; Table 1). As reported by López-López *et al.*<sup>(2)</sup>, additional salt is required in the formulations without seaweed in order to overcome certain technological problems associated with low-salt products but was not necessary in the RM with algae<sup>(2)</sup>.

### Diet preparation and experimental design

A total of sixty male growing Wistar rats with a body weight of approximately 90 g at the outset were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light–12 h dark cycle. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2005-07 204-C02-01/ALI) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 for the protection of scientific research animals. The rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) during a 1-week period of adaptation to environmental conditions and then distributed into six groups of ten animals each, according to average body weight. The following six experimental semi-synthetic diets (Table 2) were prepared: (1) the control diet (C) without added cholesterol was composed of a homogeneous mixture

**Table 1.** Some relevant components of control, Wakame and Nori restructured meats\*

	Control	Wakame	Nori
SFA (% total fatty acids)	36.72	38.49	35.82
MUFA (% total fatty acids)	52.62	50.61	51.80
PUFA (% total fatty acids)	10.66	10.91	12.38
Polyphenols (gallic acid equivalents/100 g WM)	Tr	820	2170
Soluble fibre (g/100 g WM)	0	1.1	1.33
Insoluble fibre (g/100 g WM)	2.81	1.2	0.66
Total fibre (g/100 g WM)	2.81	2.3	2.0
Fe (mg/100 g WM)	0.855	0.799	3.39
Na (mg/100 g WM)	872.8	626.7	385.5
Lys:Met ratio	2.95	2.95	3.16
Antioxidant activity ( $\mu\text{mol}$ Trolox equivalents/g WM)	0.77	1.09	1.18

WM, wet matter.

\* Data from López-López *et al.*<sup>(2)</sup>

**Table 2.** Composition (g/kg) and energy content† of the control, Wakame- and Nori-enriched meat diets with and without supplementary cholesterol\*

	Without supplementary cholesterol		With supplementary cholesterol	
	Control	Wakame or Nori	Control	Wakame or Nori
Diet AIN-93M				
Maize starch	382.75	382.75	353.59	353.59
Cholesterol			24.31	24.31
Cholic acid			4.85	4.85
Pork (freeze-dried)‡				
Control meat‡	150		150	
Wakame-enriched meat‡ or Nori-enriched meat‡		150		150

\* Other ingredients: casein, 127.5 g/kg; soyabean oil, 34 g/kg; dyetose (carbohydrate composition), 131.75 g/kg (monosaccharides, 10 g/kg; disaccharides, 40 g/kg; trisaccharides, 50 g/kg; tetrasaccharides and higher, 900 g/kg); sucrose, 85 g/kg; microcrystalline cellulose, 42.50 g/kg; salt mix§, 29.75 g/kg; vitamin mix||, 12.16 g/kg; choline bitartrate, 3.06 g/kg; L-cystine, 1.53 g/kg; L-butylhydroquinone, 0.0068 g/kg.

† Diet energy content, considering as energy equivalent for monosaccharides, 15.69 kJ/g (3.75 kcal/g); polysaccharides, 16.73 kJ/g (4.0 kcal/g); fat, 37.65 kJ/g (9.0 kcal/g); protein 16.73 kJ/g (4.0 kcal/g); soluble fibre, 8.4 kJ/g (2 kcal/g); control diet without cholesterol, 16 587.7 kJ/kg (3964.6 kcal/kg); Wakame diet without added cholesterol, 16 790.9 kJ/kg (4013.1 kcal/kg); Nori diet without added cholesterol, 16 677.9 kJ/kg (3986.1 kcal/kg); control diet with added cholesterol, 16 296.6 kJ/kg (3895.0 kcal/kg); Wakame diet with added cholesterol, 16 106.0 kJ/kg (3849.4 kcal/kg); Nori diet with added cholesterol, 16 189.9 kJ/kg (3869.5 kcal/kg).

‡ Protein, fat, minerals (ash) and fibre present in the 150 g of control, Wakame and Nori freeze-dried, restructured meats; control meat: 79.15, 52.95, 17.47 and 10 g (microcrystalline cellulose), respectively; Nori meat: 79.03, 47.82, 9.56 and 10.07 g, respectively; Wakame meat: 73.75, 52.98, 17.14 and 11.95 g, respectively.

§ Mineral mix contained AIN-93M mineral mix: calcium carbonate, 357.00 g/kg; potassium phosphate monobasic, 250.00 g/kg; potassium citrate.H<sub>2</sub>O, 28.00 g/kg; NaCl, 74.00 g/kg; potassium sulphate, 46.60 g/kg; magnesium oxide, 24.00 g/kg; ferric citrate U.S.P. (United States Pharmacopeia), 6.06 g/kg; zinc carbonate, 1.65 g/kg; manganese carbonate, 0.63 g/kg; cupric carbonate, 0.30 g/kg; potassium iodate, 0.01 g/kg; sodium selenate, 0.01 025 g/kg; ammonium paramolybdate.4H<sub>2</sub>O, 0.00 795 g/kg; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45 g/kg; chromium potassium sulphate.12.H<sub>2</sub>O, 0.275 g/kg; lithium chloride, 0.0174 g/kg; boric acid, 0.0815 g/kg; sodium fluoride, 0.0635 g/kg; nickel carbonate, 0.0318 g/kg; ammonium vanadate, 0.0066 g/kg; finely powdered sucrose, 209.806 g/kg.

|| AIN-93VX vitamin mixture: niacin, 3.00 g/kg; calcium pantothenate, 1.60 g/kg; pyridoxine.HCl, 0.70 g/kg; thiamine.HCl, 0.60 g/kg; riboflavin, 0.60 g/kg; folic acid, 0.20 g/kg; biotin, 0.02 g/kg; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00 g/kg; vitamin B<sub>12</sub> (0.1 %), 2.50 g/kg; vitamin A palmitate (150 000 µg retinol/g), 0.80 g/kg; vitamin D<sub>3</sub> (10 000 µg/g), 0.25 g/kg; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50 g/kg; sucrose, 967.23 g/kg.

of 85 % rodent diet (AIN-93M purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 15 % freeze-dried restructured pork (with 4 % wet matter microcrystalline cellulose); (2) the W diet consisted of a mixture of AIN-93M no. 180729 feed (85 %) and freeze-dried, restructured W meat (15 %); (3) the N diet consisted of a mixture of AIN-93M no. 180729 feed (85 %) and freeze-dried, restructured N meat (15 %); (4) the cholesterol-enriched control (CC) diet was identical to the C diet but with 2.43 % cholesterol (95–98 % purity) and 0.49 % cholic acid (>98 % purity), substituting an equal amount of starch (AIN-93M no. 180730 diet); (5) the cholesterol-enriched W (CW) diet was the W diet enriched with cholesterol and cholic acid; (6) the cholesterol-enriched N (CN) diet consisted of the N diet enriched with cholesterol and cholic acid. All experimental diets contained approximately 20.7 % protein, 8.7 % fat and 4.4 % total dietary fibre. Water and food were provided *ad libitum* over the 5-week experimental period.

At the end of the experiment, in order to avoid inter-assay variations that could affect the comparison of data from the different groups, animals in fasting conditions were anaesthetised and euthanised by extracting blood from the descending aorta with a syringe, taking one animal at a time, of each one of six groups.

### Growth rate

The feed conversion ratio was individually tested relating food consumption (g) to body-weight gain (g).

### Lipoprotein isolation

Blood from the descending aorta was collected into heparinised tubes. Plasma was separated from the whole blood within 30 min of collection by centrifugation at 2500 rpm (1500 g) for 20 min and kept at 4°C until lipoprotein isolation. A SW 50.1 rotor was used to separate the various classes of lipoproteins in 1 ml plasma samples. KBr (114 × 10<sup>-3</sup> g), sucrose (25 × 10<sup>-3</sup> g) and serum (1 ml) were added to the cellulose nitrate tube. The components were carefully mixed (final background density of  $d = 1.10$  g/ml) and sequentially overlaid with 2.4 ml of a salt solution of  $d = 1.06$  g/ml (11.42 × 10<sup>-3</sup> g NaCl and 75.98 × 10<sup>-3</sup> g KBr/ml) and 2.4 ml distilled water. After preparation, the gradients were spun for 7 h at 50 000 rpm (232 000 g) and 4°C, as indicated by Terpstra *et al.*<sup>(20)</sup>.

Isolation of the lipoprotein fractions was performed taking into account the conventional boundaries for rats of the different lipoprotein classes<sup>(4)</sup> (VLDL,  $\rho_{20} < 1.0063$  g/ml; intermediate-density lipoprotein (IDL) + LDL,  $\rho_{20} = 1.0063$ –1.057 g/ml; HDL,  $\rho_{20} > 1.057$  g/ml).

### Determination of cholesterol, phospholipids and TAG in the lipoprotein fractions

Cholesterol, TAG and phospholipids were determined using standard enzymatic colorimetric tests (SpINREACT S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, Spain). All intra-assay and inter-assay



CV were <5.5%. Total lipids were calculated as the sum of cholesterol, TAG and phospholipids.

#### Arylesterase activity measurement

Rat plasma AE activity was measured according to Nus *et al.*<sup>(16,17)</sup>. One unit of arylesterase was defined as the mmol phenol formed from phenyl acetate per min. Reaction rates were monitored at 270 nm in thermostated quartz cuvettes with a 10 mm light path, using a Shimadzu UV-2401 PC (Tokyo, Japan) spectrophotometer. Blanks without plasma samples were used to correct for the spontaneous hydrolysis of phenylacetate in the buffer. Each measurement was performed in duplicate.

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 15.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The results are expressed as means and standard deviations or means with their standard errors. A two-way ANOVA (cholesterol and alga) was used. Pairwise comparisons of diet responses between groups were made employing the Bonferroni test. The effect of cholesterol consumption was evaluated using an unpaired Student's *t* test. The relationship between food intake and body-weight gain, and the decrease in plasma cholesterol and the decrease in AE were tested by

Pearson's correlation test. Differences in growth rate induced by diets were assessed by the ANCOVA test. Differences were accepted as significant when  $P < 0.05$ .

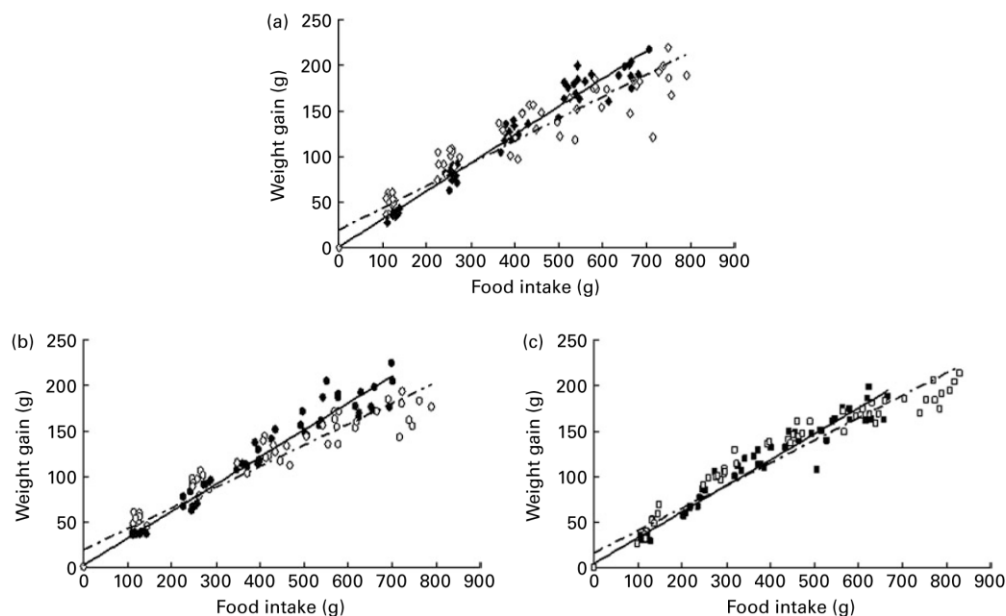
#### Results

##### Restructured meat composition

Table 1 shows some main differences between the RM compounds. RM-N contains higher soluble fibre, polyphenols and Fe than RM-W and RM-C. Minor differences were found in SFA, MUFA and PUFA percentages and in the lysine: methionine ratio. Diets have similar energy contents (16 587.7–16 677.9 kJ/kg (3964.6–4013.1 kcal/kg) for non-added cholesterol diets and 16 106.0–16 296.6 kJ/kg (3849.4–3895.0 kcal/kg) for added cholesterol diets; Table 2).

##### Growth rate

Fig. 1(a)–(c) shows the relationship between food intake and body-weight gain and the intercepts, slopes and significances found for the different groups. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the N and W diets, but the N diet induced a lower slope in body-weight evolution than the C diet ( $P < 0.05$ ). Supplementary dietary cholesterol significantly affected all growth curves (CC *v.* C; CW *v.* W and CN *v.* N, all  $P < 0.001$ ), but no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the CN and CW diets were found.



**Fig. 1.** Growth rates in rats fed the control, Wakame- and Nori-enriched meat experimental diets with and without supplementary cholesterol.  $Y = (\text{intercept with their standard error}) + (\text{slope with their standard error}) \times X$ , where  $Y$  is the body-weight gain and  $X$  is the food consumption. (a)  $\blacklozenge$ , control (C):  $Y = (1.042 \pm 2.496) + (0.307 \pm 0.006) \times X$ ;  $r^2$  0.9762;  $\diamond$ , control with supplementary cholesterol (CC):  $Y = (19.44 \pm 4.21) + (0.243 \pm 0.010) \times X$ ;  $r^2$  0.9039. (b)  $\bullet$ , Wakame (W):  $Y = (2.20 \pm 2.68) + (0.296 \pm 0.007) \times X$ ;  $r^2$  0.9709;  $\circ$ , Wakame with supplementary cholesterol (CW):  $Y = (19.10 \pm 3.66) + (0.229 \pm 0.009) \times X$ ;  $r^2$  0.9245. (c)  $\blacksquare$ , Nori (N):  $Y = (4.86 \pm 2.84) + (0.283 \pm 0.007) \times X$ ;  $r^2$  0.9667;  $\square$ , Nori with supplementary cholesterol (CN):  $Y = (16.30 \pm 3.62) + (0.246 \pm 0.008) \times X$ ;  $r^2$  0.9448. Mean values were significantly different (ANCOVA test) for C *v.* N ( $P < 0.05$ ). Mean growth rate values were significantly different (ANCOVA test) for CC *v.* C, CW *v.* W and CN *v.* N ( $P < 0.001$ ). Mean growth rate values were not significantly different (ANCOVA test) for C *v.* W, N *v.* W, CC *v.* CW, CW *v.* CN and CC *v.* CN.

**Table 3.** Plasma cholesterol, TAG, phospholipids, total lipid, arylesterase (AE), and cholesterol:phospholipid, AE:total cholesterol and AE:HDL-cholesterol ratios in rats fed the control, Wakame- and Nori-enriched meat diets with and without the cholesterol supplement  
(Mean values and standard deviations, *n* 10)

	Supplementary cholesterol	Control groups (C and CC)		Wakame groups (W and CW)		Nori groups (N and CN)		ANOVA		
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Cholesterol effect	Diet effect	Interaction
Total cholesterol (mg/l)	No	596	164	544	89	526	115	<0.001	<0.01	<0.01
	Yes	2369 <sup>a***</sup>	579	3195 <sup>a,b**</sup>	957	1140 <sup>b**</sup>	543	<0.001	<0.05	NS
TAG (mg/l)†	No	621	144	712	228	475	238	<0.001	<0.05	NS
	Yes	280 <sup>a***</sup>	57	234 <sup>a,b***</sup>	85	183 <sup>b**</sup>	48	<0.001	NS	NS
Phospholipids (mg/l)‡	No	1044	201	942	191	890	250	<0.001	NS	NS
	Yes	827	118	762	218	664 <sup>*</sup>	176	<0.001	NS	NS
Total lipids (mg/l)‡	No	2261	469	2093	569	1794	603	<0.001	NS	NS
	Yes	3510 <sup>**</sup>	708	2932	1080	2144	215	<0.001	NS	NS
Cholesterol:phospholipid	No	0.56	0.05	0.58	0.03	0.59	0.07	<0.001	NS	NS
	Yes	2.75 <sup>***</sup>	0.44	2.76 <sup>**</sup>	1.46	1.77 <sup>***</sup>	0.36	<0.001	<0.01	<0.001
AE (U/l)‡	No	10.4 <sup>b</sup>	2.8	34.8 <sup>a</sup>	10.4	43.7 <sup>a</sup>	11.1	<0.001	<0.01	<0.001
	Yes	74.1 <sup>b**</sup>	37.9	94.6 <sup>b***</sup>	10.7	27.4 <sup>a</sup>	19.9	<0.001	<0.001	<0.001
AE:total cholesterol (U/mg)	No	0.015 <sup>b</sup>	0.003	0.063 <sup>a</sup>	0.013	0.085 <sup>a</sup>	0.033	<0.05	<0.001	<0.001
	Yes	0.036 <sup>a,b*</sup>	0.022	0.052 <sup>a</sup>	0.015	0.022 <sup>b**</sup>	0.006	<0.001	<0.001	<0.001
AE:HDL-cholesterol (U/mg)	No	0.016 <sup>b</sup>	0.003	0.077 <sup>a</sup>	0.019	0.091 <sup>a</sup>	0.04	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	0.19 <sup>b**</sup>	0.01	0.51 <sup>a*</sup>	0.19	0.11 <sup>b</sup>	0.08	<0.001	<0.001	<0.001

C, control; CC, cholesterol control; W, Wakame; CW, cholesterol-enriched Wakame; N, Nori; CN, cholesterol-enriched Nori.

<sup>a,b</sup> Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $P < 0.05$ , Bonferroni's test).

Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

† To transform mg/l to mmol/l of cholesterol, TAG and phospholipids, divide data by 387, 890 and 750, respectively.

‡ Cholesterol + TAG + phospholipids. One unit of AE was defined as the mmol phenol formed from phenyl acetate per min.



### Plasma lipid concentrations and arylesterase activities

Plasma lipid data for the different groups are shown in Table 3. Significant cholesterol  $\times$  type of diet interaction ( $P < 0.001$ ) was observed for total cholesterol and AE activity and the AE:total cholesterol and AE:HDL-cholesterol ratios. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the N and W diets for total cholesterol, TAG, phospholipids, total lipids, cholesterol:phospholipids ratio, AE, AE:cholesterol ratio and AE:HDL-cholesterol ratio.

The hypercholesterolaemic dietary agent significantly increased plasma cholesterol levels in CC ( $P < 0.001$ ), CW and CN animals (both  $P < 0.01$ ). However, CN rats showed significantly ( $P < 0.001$ ) lower cholesterol levels than CC rats. Plasma TAG levels were significantly affected by dietary cholesterol ( $P < 0.001$ ) and type of diet ( $P < 0.05$ ), while only dietary cholesterol significantly influenced phospholipids, total lipids and the cholesterol:phospholipid ratio (all  $P < 0.001$ ). CN rats presented lower ( $P < 0.05$ ) phospholipid concentrations than N rats. CC rats had higher total lipid levels ( $P < 0.01$ ) than C animals. The cholesterol:phospholipid ratio was significantly higher in CC, CW and CN animals than in their C, W and N counterparts ( $P < 0.001$ ,  $< 0.01$  and  $< 0.001$ , respectively). For the total cholesterol, TAG, phospholipids, total lipids and the cholesterol:phospholipid ratio, no significant differences ( $P > 0.05$ ) between CN and CW rats were found.

The hypercholesterolaemic dietary agent significantly increased plasma AE activity in CC ( $P < 0.01$ ) and CW animals ( $P < 0.001$ ) but not in CN animals ( $P > 0.05$ ). The AE:total cholesterol ratio increased in CC ( $P < 0.05$ ) and CN animals ( $P < 0.01$ ) *v.* C and N animals, respectively. The N and W groups presented higher AE activity, AE:total cholesterol ratio and AE:HDL-cholesterol ratio than the C group (at least  $P < 0.05$ ; Table 3). CW rats showed a significantly higher ( $P < 0.05$ ) AE:HDL-cholesterol ratio than the CN and CC groups. CN rats showed a lower ( $P < 0.05$ ) AE, AE:total cholesterol ratio and AE:HDL-cholesterol ratio than CW rats.

### Lipoprotein profile

The lipid content of the different lipoprotein fractions is shown in Table 4. A significant cholesterol  $\times$  type of diet interaction was observed for VLDL-cholesterol and (IDL + LDL)-cholesterol (both  $P < 0.05$ ). Supplementary dietary cholesterol affected the cholesterol, TAG and phospholipid content of all the lipoproteins ( $P < 0.001$ ) except VLDL-phospholipids and HDL-cholesterol (both  $P > 0.05$ ). The type of diet affected VLDL-cholesterol and (IDL + LDL)-cholesterol (both  $P < 0.05$ ) and HDL-TAG ( $P < 0.01$ ). When results were studied according to the cholesterol supplement status of each group, N rats displayed lower VLDL-cholesterol levels than W rats ( $P < 0.05$ ), while the CN group had lower VLDL-cholesterol and HDL-TAG concentrations than CC animals.

CC animals presented significantly higher levels of VLDL-cholesterol ( $P < 0.01$ ), (IDL + LDL)-cholesterol ( $P < 0.001$ )

and (IDL + LDL)-phospholipids ( $P < 0.001$ ), and lower concentrations of VLDL-TAG ( $P < 0.01$ ), (IDL + LDL)-TAG ( $P < 0.05$ ), HDL-TAG ( $P < 0.001$ ) and HDL-phospholipids ( $P < 0.001$ ) than their C counterparts. Compared with N rats, CN animals had higher (IDL + LDL)-cholesterol ( $P < 0.01$ ) and (IDL + LDL)-phospholipid ( $P < 0.05$ ) levels and lower HDL-cholesterol ( $P < 0.05$ ), VLDL ( $P < 0.01$ ), (IDL + LDL)-TAG ( $P < 0.05$ ) and HDL-phospholipid ( $P < 0.05$ ) values. VLDL-cholesterol ( $P < 0.05$ ), (IDL + LDL)-cholesterol ( $P < 0.001$ ) and (IDL + LDL)-phospholipid ( $P < 0.01$ ) concentrations were higher in W rats than in CW rats, while VLDL-TAG ( $P < 0.001$ ), (IDL + LDL)-TAG ( $P < 0.05$ ), HDL-TAG ( $P < 0.05$ ) and HDL-phospholipids ( $P < 0.001$ ) were lower.

### Percentage contribution of lipids to lipoprotein composition

Fig. 2(a)–(c) shows the percentage contribution of the different lipids (% contribution) to the total VLDL, IDL + LDL and HDL lipid mass. A significant cholesterol  $\times$  type of diet interaction was observed for the percentage of cholesterol in VLDL ( $P < 0.05$ ). Cholesterol supplementation influenced the cholesterol, TAG and phospholipid composition of VLDL (all  $P < 0.001$ ).

CC, CW and CN rats presented VLDL and IDL + LDL particles enriched in cholesterol but impoverished in TAG (both  $P < 0.001$ ) with respect to VLDL and IDL + LDL of C, W and N animals, respectively (Fig. 2(a) and (b)). CN rats had VLDL with less cholesterol ( $P < 0.05$ ) than VLDL of CC and CW rats, and more TAG ( $P < 0.05$ ) than VLDL of CW rats (Fig. 2(a)). HDL particles of W rats had less cholesterol and more TAG (both  $P < 0.05$ ) than HDL particles of N rats (Fig. 2(c)). HDL particles of CC, CW and CN rats were impoverished in phospholipids with respect to HDL particles of C, W and N animals, respectively ( $P < 0.01$ ,  $< 0.05$  and  $< 0.05$ , respectively) (Fig. 2(c)). HDL particles of CC animals were enriched in cholesterol ( $P < 0.01$ ) with respect to HDL of the C group, while HDL particles of CN rats were enriched in TAG ( $P < 0.01$ ) with respect to HDL particles of N rats (Fig. 2(c)).

### Discussion

The present study shows for the first time that how the consumption of seaweed-enriched meats, with or without cholesterol supplementation, influences rat plasma AE activity and the lipoprotein profile.

In the present study, diets containing seaweed-enriched RM were generally well accepted by growing rats, as corroborated by similar intake data from other studies<sup>(8,21,22)</sup>. Rats given the N diet consumed less feed than those of the control group, probably due to the high soluble fibre content of the N alga. In agreement with Beynen *et al.*<sup>(23)</sup>, supplementary dietary cholesterol decreased the growing rate. Mahfouz & Kummerow<sup>(5)</sup> found lower body-weight gain in rabbits but not in rats fed cholesterol-enriched diets.

**Table 4.** Lipoprotein lipid concentration in rats fed the control, Wakame- and Nori-enriched meat diets with and without cholesterol supplement (Mean values and standard deviations)

	Added cholesterol	Control groups (C and CC)		Wakame groups (W and CW)		Nori groups (N and CN)		ANOVA		
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Cholesterol effect	Diet effect	Interaction
Cholesterol (mg/l)†	No	42.3 <sup>ab</sup>	18.9	65.2 <sup>a</sup>	32.9	28.4 <sup>b</sup>	13.4	<0.001	<0.05	<0.05
VLDL	Yes	524.4 <sup>ab</sup>	411.5	373.1 <sup>ab</sup>	267.4	112.3 <sup>b</sup>	163.4			
IDL + LDL	No	11.6	6.0	21.3	13.1	13.5	7.4	<0.001	<0.05	<0.05
HDL	Yes	1251.2 <sup>ab</sup>	383.8	1165.7 <sup>ab</sup>	498.7	690.2 <sup>ab</sup>	386.9			
	No	535.3	142.1	442.3	48.9	495.1	112.8	NS	NS	NS
TAG (mg/l)†	Yes	487.4	249.7	374.1	350.2	297.5 <sup>a</sup>	152.9			
VLDL	No	321.9	122.5	428.6	187.5	270.0	172.6	<0.001	NS	NS
IDL + LDL	Yes	88.3 <sup>ab</sup>	48.3	56.7 <sup>ab</sup>	20.5	47.3 <sup>ab</sup>	43.7			
	No	59.2	18.4	50.2	24.3	36.7	18.7	<0.001	NS	NS
HDL	Yes	26.3 <sup>a</sup>	8.7	25.1 <sup>a</sup>	10.0	18.9 <sup>a</sup>	12.9			
	No	207.9	25.8	220.3	47.6	157.9	56.6	<0.001	<0.01	NS
Phospholipids (mg/l)†	Yes	168.1 <sup>ab</sup>	28.5	154.2 <sup>ab</sup>	53.2	120.2 <sup>b</sup>	14.5			
VLDL	No	101.5	45.7	86.2	57.5	52.2	31.4	<0.05	NS	NS
IDL + LDL	Yes	216.6 <sup>a</sup>	134.2	199.2	230.7	64.7	79.3			
	No	15.4	5.9	10.1	3.8	19.0	13.3	<0.001	NS	NS
HDL	Yes	209.5 <sup>ab</sup>	75.9	179.8 <sup>ab</sup>	82.6	146.0 <sup>a</sup>	111.5			
	No	900.2	163.9	848.9	112.1	840.3	203.3	<0.001	NS	NS
Total lipids (mg/l)††	Yes	417.7 <sup>ab</sup>	126.2	345.6 <sup>ab</sup>	82.2	399.7 <sup>ab</sup>	61.6			
VLDL	No	485.6	163.3	602.6	271.3	360.3	221.3	NS	<0.05	NS
IDL + LDL	Yes	829.2	567.1	629.1	469.7	224.3	283.4			
	No	86.2	21.7	80.2	29.9	69.4	25.3	<0.001	<0.05	NS
HDL	Yes	1486.9 <sup>ab</sup>	454.4	1370.6 <sup>ab</sup>	514.3	855.1 <sup>a</sup>	497.0			
	No	1643.4	286.5	1509.2	180.5	1488.5	350.3	<0.001	NS	NS
	Yes	1073.2 <sup>a</sup>	371.6	873.8 <sup>ab</sup>	360.1	817.4 <sup>ab</sup>	213.7			

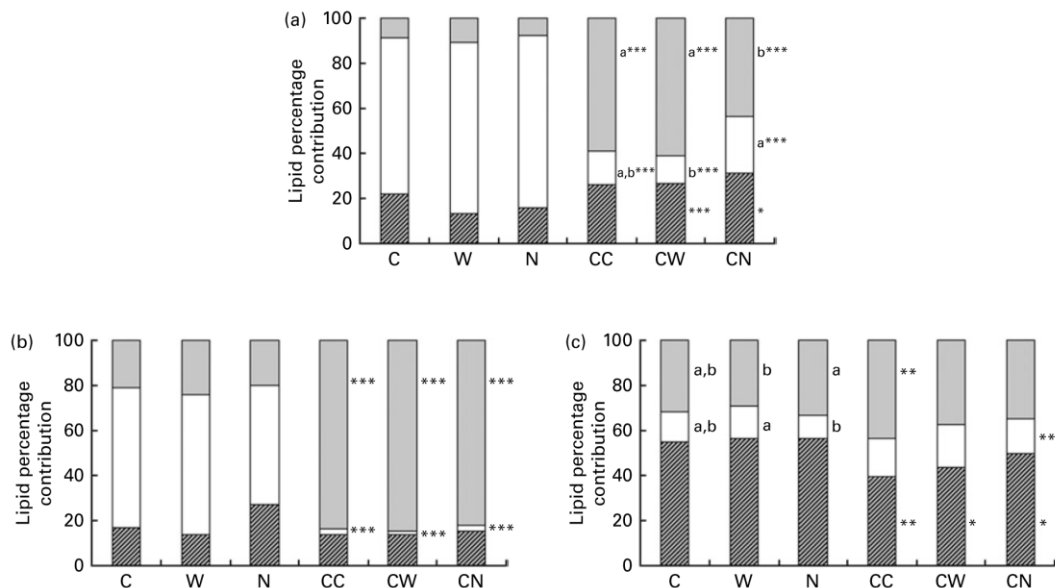
C, control; CC, cholesterol control; W, Wakame; CW, cholesterol-enriched Wakame; N, Nori; CN, cholesterol-enriched Nori; IDL, intermediate-density lipoprotein.

<sup>ab</sup> Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $P < 0.05$ , Bonferroni's test).Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

† To transform mg/l to mmol/l of cholesterol, TAG and phospholipids, divide data by 387, 890 and 750, respectively.

‡ Cholesterol + TAG + phospholipids.

## Seaweed-enriched meat and lipoproteinaemia



**Fig. 2.** Percentage contribution (%) of the different lipids to the total lipid mass of (a) VLDL, (b) intermediate-density lipoprotein (IDL) + LDL and (c) HDL in rats fed the control (C), Wakame (W)- and Nori (N)-enriched meat experimental diets and the cholesterol-enriched control (CC), Wakame (CW) and Nori (CN) meat experimental diets. Mean values were significantly different for cholesterol  $\times$  diet interaction for VLDL-cholesterol and LDL + IDL-TAG ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Mean values within the same lipoprotein lipid for C, W and N or for CC, CW and CN with unlike letters were significantly different ( $P < 0.05$ , Bonferroni's test), represented by vertical bar areas. Mean values within the same lipoprotein for C v. CC, W v. CW and N v. CN were significantly different (represented by vertical bar areas) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ ). □, Cholesterol; ▒, TAG; ▨, phospholipids.

#### Lipidaemia and lipoproteinaemia and plasma arylesterase activity

Several animal models have been used to study cholesterol and atherogenesis, but no single model is considered perfect for extrapolating results to humans<sup>(24)</sup>. Rats are the animals most commonly used in cholesterol metabolism studies and one of the most often used to study the cholesterolaemic effect of proteins<sup>(24–27)</sup>. Bovine bile or colic acid has been extensively used in animal studies to increase dietary cholesterol absorption and thus the hypercholesterolaemic effect of this sterol<sup>(24–28)</sup>. Dietary casein does not induce hypercholesterolaemia when the diet contains no cholesterol supplement<sup>(21)</sup>. The present study demonstrated that when cholesterol was not added to the diet, the consumption of C, W and N maintained normal levels of cholesterol, TAG and phospholipids in rats<sup>(4,29–31)</sup>. In addition, the cholesterol: phospholipid ratio, used as a marker of hypercholesterolaemia<sup>(29)</sup>, remained low in C, W and N rats, suggesting normocholesterolaemia<sup>(29)</sup>. Inclusion of seaweed-enriched RM in the diet increased AE activity, suggesting an improvement in antioxidant status. AE, which binds to HDL and other lipoproteins<sup>(32)</sup>, is involved in lipoprotein metabolism and inhibits lipoperoxidation in LDL and HDL<sup>(33)</sup>. AE activity increases in rats consuming pomegranate polyphenols<sup>(34)</sup> or seaweeds<sup>(4)</sup>. The presence of antioxidants and other phytochemicals in algae<sup>(4)</sup> at least partially explains the greater absolute AE activity in N and W rats than that observed in C animals.

The same effect or tendency was observed when data were adjusted for cholesterol and HDL-cholesterol.

The absolute lipid content and composition of IDL + LDL and HDL in the C group were comparable with those reported in other studies<sup>(13,35)</sup>. HDL-cholesterol accounts for 85% or more of total cholesterol. Rats, moreover, display a very effective uptake of VLDL and a low transference of apoB from VLDL to LDL<sup>(36)</sup>, which explain the low levels of LDL found in the present study and in previous investigations<sup>(13,29,35,37)</sup>.

In general terms, lipoprotein fraction composition was similar in C, W and N rats. Nonetheless, the VLDL lipid mass (cholesterol + TAG + phospholipids) was higher in rats on the W diet and lower in those fed the N diet, suggesting that the former diet increased the production of lipoproteins while the latter decreased it. According to their lipid composition, the HDL of N rats appears to be more anti-atherosclerotic lipoproteins than the HDL of W rats<sup>(37)</sup>. Differences in lipid and lipoprotein levels between groups without the cholesterol supplement must first be attributed to the different total fibre and soluble fibre contents of the diets and, second, to other compounds, such as minerals, which may also affect lipaemia<sup>(3,4,38)</sup>. N contains more viscous-soluble fibre and polyphenols than W, partially explaining why lipaemia values in W rats were higher than those in their N counterparts. A previous publication of our group<sup>(39)</sup> has reported that algal remains were found in the caecum of rats fed Konbu seaweed, but not in animals fed N, suggesting clear differences in gastric emptying time and digestion speed between the two algal diets.



Consistent with the results of other studies<sup>(25–27,40,41)</sup>, the CC diet induced hypercholesterolaemia and decreased triacylglycerolaemia<sup>(4,21,37)</sup>, producing very large amounts of  $\beta$ -VLDL and large quantities of LDL, and reducing the amount of total lipids transported by the HDL fraction. The CN diet partially blocked the hypercholesterolaemic induction observed in the CC and CW diets. As commented earlier, the higher soluble fibre and polyphenols of N than W<sup>(2)</sup> may be involved in the hypocholesterolaemic effect of the CN diet. These results were similar to those observed after adding N (7%)<sup>(4)</sup> or fried sardines<sup>(26)</sup> to cholesterol-enriched diets.

The hypercholesterolaemic treatment increased AE activity in CC and CW rats, but unexpectedly, this was not observed in rats consuming the CN diet. Some algal compounds could be involved. RM-N contains three times more Fe than RM-W or RM-C; thus, a higher pro-oxidant effect in the CN group than in the other groups could be expected in the framework of cholesterol-enriched diets. Cholesterol is mainly eliminated from the body via bile acid production. Biosynthesis of cholic acid via cytochrome P450 increases the production of free radical substances. Thus, AE activity could be used to avoid lipoprotein peroxidative damage<sup>(42,43)</sup>, acting as a suicide enzyme in CN animals<sup>(43)</sup>. In fact, a positive and significant correlation ( $P=0.030$ ) was found between the decrease in cholesterol and that in AE in the CW + CN groups with respect to the CC group (data not shown).

These results differ from those found by Bocanegra *et al.*<sup>(4)</sup>, as AE decreased in non-fasted rats fed the cholesterol-enriched control diet. However, similar data were obtained in rats fed the diet enriched in N and cholesterol. Thus, fasting and/or certain meat compounds, such as Fe, may explain differences between control diets of both studies. Nonetheless, the results on AE are difficult to be explained and deserve further studies to be confirmed.

TAG levels of N rats tended to be lower than those of C rats, while those of W animals were higher. Bocanegra *et al.*<sup>(4)</sup> observed that postprandial TAG levels in control rats were similar to those given N for 3 weeks, while Murata *et al.*<sup>(44)</sup> reported that plasma and liver cholesterol levels decreased in rats given a diet containing a mixture of fish and W for 4 weeks.

Plasma cholesterol levels rose in all rats consuming cholesterol-enriched diets, but particularly in CC and CW rats due to an increase in cholesterol-enriched VLDL<sup>(4,23,25,37)</sup>. VLDL-cholesterol concentrations of CN animals decreased, while those of CW rats resembled those of CC animals, suggesting that the N diet decreased  $\beta$ -VLDL levels, partially normalising the VLDL fraction of CN animals. Some researchers have reported that the water-soluble fractions of seaweeds or isolated algal polysaccharides showed hypocholesterolaemic and anti-hypertensive properties in experimental animals, a finding that would explain the hypocholesterolaemic effect of the CN diet in rats of the present study<sup>(13,45)</sup>.

The lipid content of the IDL + LDL fraction increased several-fold in animals given the cholesterol-enriched diets. However, this increase in CN rats was of lower magnitude than in CC or CW rats. Rats, moreover, display a very effective uptake of VLDL and a low transference of apoB from VLDL to

LDL<sup>(46)</sup>. According to Havel<sup>(47)</sup>, large VLDL contributes less to the formation of LDL than small VLDL in rats and other animals.

HDL-cholesterol levels were lower in CC, CW and CN animals than in their C, W and N counterparts. The hepatic scavenger receptor B-I plays an essential role in the hepatic uptake of plasma HDL-derived cholesterol and cholesterol esters for excretion into the bile<sup>(48–50)</sup>. Scavenger receptor B-I deficiency results in a significant increase in plasma HDL-cholesterol and increased atherosclerotic lesions in a mouse<sup>(51)</sup>. Combined deficiencies of scavenger receptor B-I and apoE profoundly alter lipoprotein metabolism, plasma cholesterol in VLDL-sized and in abnormally large HDL-like particles<sup>(51)</sup>. This may explain the lower HDL-cholesterol in rats given the cholesterol-enriched diets than in those on the non-cholesterol-enriched diets.

In conclusion, diets including seaweed-enriched meat were well accepted and resulted in acceptable growth ratios and increased AE activity. The present results suggest the convenience of including only some specific seaweeds in meat derivatives to obtain functional meats, as N but not W partially blocked the hypercholesterolaemic effect of dietary cholesterol and partially normalised VLDL and LDL lipid levels and composition. Future studies are needed to understand the relationship between AE and cholesterol changes. The convenience of studying the effect of seaweed-enriched RM on lipid metabolism in different models, including human subjects, is emphasised.

#### Acknowledgements

The present study was supported by the Spanish projects AGL2005-07204-C02-01/ALI, AGL-2008 04892-C03-02 and Consolider-Ingenio 2010 project no. CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the predoctoral fellowship of the Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) from the Bolivarian Republic of Venezuela to R. O.-D., that of the Universidad Complutense, Madrid, Spain to A. S.-M. and the foreign fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México to L. G.-T. All authors have significantly contributed to the manuscript and agree with the present version of the paper. F. J. S.-M. contributed to the study design, data discussion and writing of the manuscript. R. O.-D., A. S.-M., L. G.-T. and S. B. contributed to the data acquisition and analysis and writing of the manuscript. J. B., M. J. G.-M., M. V.-V. and M. I. S.-R. contributed to the data discussion and made a critical review of the manuscript. The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

1. Jimenez-Colmenero F, Carballo J & Cofrades S (2001) Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci* **59**, 5–13.
2. López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, *et al.* (2009) Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* **83**, 492–498.

3. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, *et al.* (2009) Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food* **12**, 1–24.
4. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, *et al.* (2009) Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br J Nutr* **102**, 1728–1739.
5. Mahfouz MM & Kummerow FA (2000) Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* **11**, 293–302.
6. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, *et al.* (1999) Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* **354**, 1234–1241.
7. Iwai K (2008) Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown Alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice. *Plant Foods Hum Nutr* **63**, 163–169.
8. Bocanegra A, Benedi J & Sanchez-Muniz FJ (2006) Differential effects of Konbu and Nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* **95**, 696–702.
9. Schultz Moreira A, González-Torres L, Olivero-David R, *et al.* (2010) Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* **65**, 290–298.
10. Barter PJ & Rye KA (1996) High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* **121**, 1–12.
11. Shaish A, Harari A, Hananshvili L, *et al.* (2006) 9-*Cis*  $\beta$ -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. *Atherosclerosis* **189**, 215–221.
12. Castelli WP (1996) Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* **124**, 1–9.
13. Wong KH, Sam SW, Cheung PCK, *et al.* (1999) Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr Res* **19**, 1519–1527.
14. Ross R (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115–126.
15. Canales A & Sánchez-Muniz FJ (2003) Paraonase, something more than an enzyme? *Med Clin (Barc)* **121**, 537–548.
16. Nus M, Sánchez-Muniz FJ & Sánchez-Montero JM (2006) A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid. *Atherosclerosis* **188**, 155–159.
17. Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sinisterra Gago JV, *et al.* (2008) Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics. *Enzyme Microb Technol* **43**, 252–256.
18. Nus M, Sánchez-Muniz FJ & Sánchez-Montero JM (2007) Arylesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de un enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I (Arylesterase. Methodological and functional aspects of a key enzyme in cardiovascular disease. Part I). *An R Acad Nat Farm* **74**, 5–27.
19. Wright MO, Burden V, Lee J, *et al.* (1999) High dietary iron enhances oxidative stress in liver but does not increase aberrant crypt foci development in rats with low vitamin E status. *Nutr Cancer* **35**, 143–152.
20. Terpstra AH, Woodward CJ & Sanchez-Muniz FJ (1981) Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem* **111**, 149–157.
21. Viejo J, García-Linares C, Bastida S, *et al.* (2003) Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int* **9**, 329–338.
22. Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, *et al.* (2002) Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr* **133**, 2302–2308.
23. Beynen AC, Boogaard A, Van Laack HL, *et al.* (1984) Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr* **114**, 1640–1651.
24. Jacques H (1990) Effects of dietary fish proteins on plasma cholesterol and lipoproteins in animal models and in humans. In *Dietary Proteins, Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis*, pp. 59–70 [M Sugano and AC Beynen, editors]. Basle: Karger Basel.
25. Chiang MT, Chen YC & Huang AL (1998) Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid. *Int J Vitam Nutr Res* **68**, 328–334.
26. Sánchez-Muniz FJ, Higón E, Cava F, *et al.* (1992) Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J Agric Food Chem* **40**, 2226–2231.
27. Sánchez-Muniz FJ, Viejo JM & Medina R (1992) Deep frying of sardines in different culinary fats. Changes in the fatty acid composition of sardines and frying fats. *J Agric Food Chem* **40**, 2252–2256.
28. Terpstra AH, Lapre JA, De Vrie HT, *et al.* (2000) Hypocholesterolemic effect of dietary psyllium in female rats. *Ann Nutr Metab* **44**, 223–228.
29. Sanchez-Muniz FJ & Bastida S (2008) Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol* **110**, 295–301.
30. García-Linares MC, Bastida S, García-Arias MT, *et al.* (2003) Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Tech Int* **9**, 329–338.
31. Vázquez J & Sánchez-Muniz FJ (1994) Proteína de pescado y metabolismo de colesterol (Fish protein and cholesterol metabolism). *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment* **34**, 589–608.
32. Fuhrman B, Volkova N & Aviram M (2005) Paraonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* **180**, 55–61.
33. Aviram M (2004) Introduction to the serial review on paraonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **37**, 1301–1303.
34. Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, *et al.* (2008) Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J Agric Food Chem* **56**, 8704–8713.
35. Garrido-Polonio C, García-Linares MC, García-Arias MT, *et al.* (2004) Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr* **92**, 257–265.
36. Sigurdsson G, Nicoli A & Lewis B (1975) Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *J Clin Invest* **56**, 1481–1490.
37. Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, *et al.* (2003) Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolaemic rats. *J Nutr* **133**, 2302–2308.
38. Gueux E, Mazur A, Rayssiguier Y, *et al.* (1996) Lipid fluidity of triacylglycerol-rich lipoproteins isolated from copper-deficient rats. *Br J Nutr* **75**, 767–773.

39. Bocanegra A, Nieto A, Blas B, *et al.* (2003) Diets containing a high percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food Chem Toxicol* **41**, 1473–1480.
40. Krauss RM, Eckel HR, Howard B, *et al.* (2000) AHA dietary guidelines. Revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* **102**, 2284–2299.
41. Fukushima M, Ohhashi T, Ohno S, *et al.* (2001) Effects of diets enriched in *n*-6 or *n*-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* **36**, 261–266.
42. Reilly MP, Pratico D, Delanty N, *et al.* (1998) Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**, 2785–2787.
43. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, *et al.* (1998) Paraoxonase inhibits high density lipoproteins (HDL) oxidation and preserves its functions, a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* **101**, 1581–1590.
44. Murata M, Sano Y, Ishihara K, *et al.* (2001) Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J Nutr* **132**, 742–747.
45. Jimenez-Escrig A & Sanchez-Muniz FJ (2000) Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* **20**, 585–598.
46. Sigurdsson G, Nicoli A & Lewis B (1975) Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *J Clin Invest* **56**, 1481–1490.
47. Havel RJ (1984) The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res* **25**, 1570–1576.
48. Acton S, Rigotti A, Landschultz KT, *et al.* (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518–520.
49. Mardones P, Quinones V, Amigo L, *et al.* (2001) Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* **42**, 170–180.
50. Zhou H, Li Z, Silver LD, *et al.* (2006) Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 1482–1488.
51. Braun A, Trigatti BL, Post MJ, *et al.* (2000) Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apoE-deficient mice. *Circ Res* **90**, 270–276.

## 5.2. PUBLICACIÓN N°2.

**Enviada a Journal of Medicinal Food.**

**Efectos protectores del reestructurado cárnico Espagueti de Mar contra el colesterol dietético. Efectos en la arilesterasa, perfil y composición lipoproteica en ratas en crecimiento**

Adriana R. Schultz Moreira; Raúl Olivero-David; Miguel Vázquez-Velasco; Laura González-Torres; Juana Benedí; Sara Bastida; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Existe una asunción que las algas son hipocolesterolémicas y antioxidantes; sin embargo, resultados controvertidos sugieren que cada alga tiene propiedades individuales. Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del reestructurado de cárnico (RC) con Espagueti de mar (E), enriquecido o no con colesterol sobre la actividad de la arilesterasa (AE), concentración y composición de lipoproteínas de ratas Wistar. Cuatro grupos de diez ratas Wistar macho en crecimiento fueron alimentadas con la mezcla de la dieta 85% AIN-93M y 15% de liofilizado RC durante 5 semanas. El grupo C consumió RC control, el grupo E consumió RC con 5% Espagueti de mar, el CC consumió el grupo C enriquecido con colesterol (2.43 %) y ácido cólico (0.49 %) mientras que el grupo CE consumió el grupo E enriquecido con colesterol y ácido cólico. La actividad de la AE fue 5 veces incrementada ( $p<0,01$ ) en el grupo E vs. C pero 3 veces menor en el grupo CE vs. CC ( $p<0,01$ ). La dieta CC indujo hipercolesterolemia pero redujo los niveles de triglicéridos (TG) incrementando la presencia de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) la cual fue enriquecida en colesterol. La dieta del grupo CE parcialmente bloqueó ( $p<0,001$ ) la hipercolesterolemia inducida por la dieta CC, y redujo los niveles de TG ( $p<0,05$ ) comparados con las ratas que recibieron la dieta E. La suplementación del colesterol incrementó el colesterol total, VLDL-colesterol y lipoproteínas de densidad intermediaria (IDL)-colesterol +lipoproteínas de baja densidad (LDL)-colesterol (IDL+LDL)-colesterol ( $p<0,001$ ) en el grupo de ratas que recibieron la dieta CC pero el efecto fue menor en el grupo de los animales que recibieron la dieta CE. Concluye que los RC con Espagueti de mar incrementa la capacidad antioxidante en el marco de dietas enriquecidas con colesterol.

**Journal of Medicinal Food**

Journal of  
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

**Protective effects of Sea Spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol. Effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats**

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Schultz Moreira, Adriana; Universidad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Nutrición Olivero-David, Raúl; Universida de Alcalá, Fac Farmacia. Dpto Nutrición, Bromatología y Toxicología Vázquez-Velasco, Miguel; Universidad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Nutrición González-Torres, Laura; Universidad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Nutrición Benedí, Juana; Universiodad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Farmacología Bastida, Sara; Universidad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Nutrición Sánchez-Muniz, Francisco; Universidad Complutense, Fac Farmacia. Dpto Nutrición;
Keyword:	Antioxidant Activity, lipidmetabolism

SCHOLARONE™  
Manuscripts



**Protective effects of Sea Spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol. Effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats**

Adriana R. Schultz Moreira<sup>1</sup>, Raúl Olivero-David<sup>1,2</sup>, Miguel Vázquez-Velasco<sup>1</sup>, Laura González-Torres<sup>1</sup>, Juana Benedí<sup>3</sup>, Sara Bastida<sup>1</sup>, and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain*

<sup>2</sup>*Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, E-28871 Madrid, Spain*

<sup>3</sup>*Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain*

\*Corresponding author: Prof. Dr. Francisco J. Sánchez-Muniz, phone: +34-913941828; fax: +34-913941810, email: [frasan@ucm.es](mailto:frasan@ucm.es)

Running title: Pork added alga and rat lipoprotein profile

**ABSTRACT**

There is a general assumption that seaweeds are hypocholesterolaemics and antioxidants; however, controversial results suggest specific properties for each individual alga. This study aims to assess the effect of including Sea Spaghetti alga (S) in a restructured-pork (RP) diet, whether enriched or not in dietary cholesterol on arylesterase (AE) activity and lipoprotein concentration and composition of Wistar rats. Four groups of ten growing male Wistar rats each were fed a mix of 85% AIN-93M diet and 15% freeze-dried RP for 5-wks. The control group (C) consumed control RP-C, the S group RP-S with 5%, the Chol-C consumed C diet but enriched in cholesterol (2.43 %) and cholic acid (0.49 %) while the Chol-S groups consumed the S diet but enriched in cholesterol and cholic acid. AE activity was 5-times higher ( $P < .01$ ) in S vs C rats but 3-times lower in Chol-S vs. Chol-C rats ( $P < .01$ ). Chol-C diet induced hypercholesterolaemia but reduced triglycerides (TG) giving rise to the presence of very low-density lipoprotein (VLDL) which was enriched in cholesterol. The Chol-S diet partially blocked ( $P < .001$ ) the hypercholesterolaemic induction of Chol-C diet, and reduced TG levels ( $P < .05$ ) with respect to S rats. The cholesterol supplementation increased total cholesterol, VLDL-cholesterol and intermediate-density lipoprotein+LDL-cholesterol (IDL+LDL)-cholesterol ( $P < .001$ ) in Chol-C rats but the effect was lower in the Chol-S diet. It is concluded that Sea Spaghetti-RP increases the antioxidant capacity in the frame of non-cholesterol enriched diet while improving the lipoprotein profile in the frame of cholesterol-enriched diets.

43

**KEY WORDS: Arylesterase, Cholesterol, Lipoproteins, Restructured pork, Seaweeds**

46

## 47 INTRODUCTION

48 Pork is a basic dietary component supplying a large number of nutrients.<sup>1,2</sup>  
49 However, their consumption has been epidemiologically linked to coronary heart  
50 disease (CHD),<sup>3</sup> an inflammatory disease associated with hypercholesterolemia and  
51 hypertension.<sup>4</sup> Hypercholesterolaemia is associated with increased oxidative stress in  
52 animals<sup>5</sup> and humans.<sup>6,7</sup> Thus, dietary intake of antioxidants may reduce the incidence  
53 and prevalence of CHD and other degenerative diseases.<sup>8</sup>

54 Sea Spaghetti seaweed (*Himanthalia elongata*) offers considerable potential as  
55 functional food ingredient due to its dietary fibre, mineral and trace element, protein and  
56 lipid content and composition, which can explain their high antioxidant capacity<sup>9-11</sup> and  
57 hypocholesterolaemic effects.<sup>4,12</sup> Nevertheless, previous studies of our group show  
58 controversial effects of the consumption of seaweeds<sup>13-14</sup> and restructured pork (RP)  
59 containing seaweeds on plasma cholesterolaemia and endogenous antioxidant enzyme  
60 activities.<sup>15-17</sup>

61 Modifications of the lipoprotein profile increase the risk of CHD.<sup>18-21</sup> Moreover,  
62 increased lipoprotein oxidation constitutes one of the major atherosclerosis risk  
63 factors.<sup>21,22</sup> Arylesterase (AE), one of the enzymatic activities of paraoxonase-1,<sup>23,24</sup>  
64 plays a protective pleiotropic role against peroxidation of LDL and other lipoproteins.<sup>23-</sup>  
65 <sup>25</sup> In the present study, we hypothesize that Sea spaghetti added to RP reduces the  
66 hypercholesterolaemic effect of cholesterol-enriched-RP diets, partially normalizing the  
67 lipoprotein profile and increasing AE activity, helping to maintain the antioxidant status  
68 of lipoproteins in rats fed RP-diets added of hypercholesterolaemic inductors. Due to  
69 the growing demand for alternative treatments for CHD, the present study investigates  
70 the effects of 5wk consumption of cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched

diets including RP containing Sea Spaghetti (RP-S) on AE activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats.

73

## 74 MATERIALS AND METHODS

75

### 76 *Materials*

77 Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*), a brown seaweed (Phaeophyceae), was obtained  
78 from Algamar C.B. (Redondela, Pontevedra, Spain). The seaweed was ground in a mill  
79 (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Germany), passed through a screen with  
80 an aperture of 0.25 mm and stored in plastic flasks at  $4 \pm 2$  °C. Meat raw materials  
81 (post-rigor pork and pork backfat), seaweed and additives (sodium chloride, sodium  
82 tripolyphosphate and sodium nitrite) were used as reported by Cofrades *et al.*<sup>26</sup> The  
83 final mixture was homogenised under vacuum for 2 min. Each sample was prepared in  
84 duplicate. **Table 1** shows information on dietary compounds. RP with Sea Spaghetti  
85 (RP-S) contained less Na than control RP (RP-C) (565.9 and 873.8 mg/100 g,  
86 respectively).<sup>27</sup> The polyphenols content (as gallic acid equivalent, mg/100g) of RP-C  
87 and RP-S was trace and 2,570, respectively.<sup>34</sup> The fatty acid profile (% total fatty acids)  
88 for RP-C and RP-S was 36.72% and 37.61 of saturated fatty acids, respectively; 52.62  
89 and 50.02, respectively of monounsaturated fatty acids; and 10.66 and 12.37 of  
90 polyunsaturated fatty acids, respectively.<sup>34</sup>

91

### 92 *Diet preparation*

93 Four experimental semi-synthetic diets (Table 1) were prepared: (a) the RP-C diet (C)  
94 contained 85% AIN-93 M purified rodent diet (DYETS, Inc., Bethlehem, PA, USA) and  
95 15% freeze-dried control RP to which 4% cellulose had been added; (b) the RP-S diet

(S) consisted of a mixture of AIN-93 M (85%) and freeze-dried Sea Spaghetti RP (15%); (c) the Cholesterol-control RP diet (Chol-C) was identical to the C diet but with 2.43% cholesterol (95%–98% purity) and 0.49% cholic acid (>98% purity) substituting an equal amount of starch; (d) the Cholesterol-Sea Spaghetti RP diet (Chol-S) was the S diet enriched with cholesterol and cholic acid.

The study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24th November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE).

#### *Dietary treatments*

Forty growing male Wistar rats with a body weight of approximately 90g at the outset were obtained from Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona (Spain). Rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) for 1 wk to adapt to environmental conditions. The animals were randomly divided into four groups of 10 rats each and housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 18^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light–dark cycle.

Diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 4.2% total dietary fibre. Water and food were provided *ad libitum* over the 5-week experimental period. At the end of the experiment, in order to avoid inter-assay variations that could affect the comparison of data from the different groups, animals in fasting conditions were anaesthetised and euthanised by extracting blood from the descending aorta with a syringe, taking one animal at a time of each one of four groups.

#### *Growth rate*

121 The feed conversion ratio was individually tested relating food consumption (g) to  
122 body-weight gain (g).

123

124 *Lipoprotein isolation*

125 Blood from the descending aorta was collected into heparinised tubes. Plasma was  
126 separated after blood collection by centrifugation at 2500 rpm for 20 min and kept at  
127 4°C until lipoprotein isolation. Rat lipoproteins were separated and isolated by salt  
128 gradient ultracentrifugation for 7h at 50,000 rpm (232,000 g) at 4°C following a  
129 modification of the Terpstra *et al.* method<sup>28</sup> as indicated by Olivero-David *et al.*,<sup>16</sup>  
130 taking into account the conventional boundaries for rats of the different lipoprotein  
131 classes (VLDL,  $\rho_{20}$ , 1.0063 g/ml; intermediate density lipoprotein (IDL)+LDL,  $\rho_{20}$  =  
132 1.0063–1.057 g/ml; HDL,  $\rho_{20}$  > 1.057 g/ml).<sup>17</sup>

133

134 *AE activity measurement*

135 Rat plasma AE activity was measured in a Shimadzu UV-2401 PC (Tokyo, Japan)  
136 spectrophotometer according to Nus *et al.*<sup>29</sup> One unit of arylesterase was defined as the  
137 mmol phenol formed from phenyl acetate per min.

138

139 *Determination of cholesterol, phospholipids and triglycerides in the lipoprotein*  
140 *fractions*

141 Cholesterol, triglycerides (TG) and phospholipids were determined using standard  
142 enzymatic colorimetric tests (SPINREACT S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).  
143 Total lipids were calculated as the sum of cholesterol, TG, and phospholipids.

144

145 *Statistical analyses*



1  
2  
3  
4 146 Statistical analyses were performed using the SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago,  
5  
6 147 IL, USA). The results are expressed as means  $\pm$  SD. A two-way ANOVA (cholesterol  
7  
8 148 and diet-type) was used. Pairwise comparisons to test the effect diet-type or cholesterol  
9  
10 149 consumption were performed using the unpaired Student's  $t$  test. Differences in growth  
11  
12 150 rate induced by diets were assessed by the ANCOVA test. Differences were accepted as  
13  
14 151 significant when  $P < .05$ .  
15  
16  
17  
18  
19

## 20 153 RESULTS

### 21 154 22 23 155 *Food intake and Growth rate*

24  
25  
26 156 A significant cholesterol x alga interaction was found for food intake ( $P < .001$ ), and  
27  
28 157 body weight gain ( $P = .042$ ). Cholesterol in the diet significantly increased food intake  
29  
30 158 ( $P < .001$ ); the S group ate significantly less (in g/day) than the C group did ( $17.8 \pm 1.1$  vs  
31  
32 159  $19.1 \pm 1.0$ , respectively;  $P < .05$ ) whilst the Chol-S group ate more than the Chol-C group  
33  
34 160 ( $22.8 \pm 0.9$  vs  $21.2 \pm 1.2$ , respectively;  $P < .011$ ). The S group showed lower body weight  
35  
36 161 gain (in g/day) than the C group ( $4.7 \pm 0.5$  vs  $5.5 \pm 0.5$ , respectively,  $P < .01$ ) while Chol-S  
37  
38 162 and Chol-C displayed similar bodyweight gain ( $5.1 \pm 0.7$  vs  $5.1 \pm 0.8$ , respectively,  $P >$   
39  
40 163  $.05$ ).  
41  
42  
43

44 164 Chol-C and Chol-S rats ate more ( $P < .001$ ) but had lower growing trends,  
45  
46 165 calculated as the relationship between food consumption and body weight gain (slopes  
47  
48 166  $0.243 \pm 0.010$  g/g and  $0.231 \pm 0.008$ , respectively) than had their C ( $P < .05$ ) and S ( $P <$   
49  
50 167  $.001$ ) counterparts ( $0.307 \pm 0.006$  g/g and  $0.276 \pm 0.009$  g/g, respectively). S rats display a  
51  
52 168 significant lower growing trend than C rats ( $P < .01$ ). Non-significant differences ( $P > .1$ )  
53  
54  
55 169 were observed between Chol-S and Chol-C rats.  
56  
57  
58  
59  
60

171 *Lipaemia and AE activity*

172 Table 2 shows the effect of alga and dietary cholesterol on plasma total cholesterol, TG,  
173 phospholipids, total lipid, the cholesterol/phospholipid ratio, AE and AE/cholesterol and  
174 AE/HDL-c ratios. Plasma cholesterol was significantly affected by the cholesterol x  
175 alga interaction, and the presence of alga and cholesterol. Chol-C and Chol-S rats  
176 showed significantly higher plasma cholesterol than their C and S counterparts. Chol-S  
177 rats had significantly lower serum cholesterol than Chol-C rats. Chol-C and Chol-S rats  
178 presented significantly lower TG. Chol-S rats presented significantly lower  
179 phospholipids than their S counterparts and Chol-C counterparts. The total lipids were  
180 significantly higher in Chol-C group compared with C counterpart but Chol-S was  
181 significantly lower in comparison to Chol-C. The cholesterol/phospholipids ratio was  
182 significantly higher in Chol-C and Chol-S compared with their C and S counterparts, and  
183 lower in Chol-S compared with Chol-C. AE was significantly affected by the  
184 cholesterol x alga interaction. Chol-C rats presented higher AE compared with C rats,  
185 however, Chol-S tended to have lower AE than S rats. The AE/total cholesterol ratio  
186 was higher in Chol-C compared with C counterpart, however, AE in Chol-S tended to  
187 be lower than in S counterparts.

188

189 *Lipoprotein lipid concentration*

190 **Table 3** shows the lipoprotein lipid concentrations of the different groups. A significant  
191 cholesterol x alga interaction was observed for VLDL-cholesterol and (IDL+LDL)-  
192 cholesterol. Supplementary cholesterol significantly affected the cholesterol, TG and  
193 phospholipid contents of all lipoproteins. The type of diet significantly affected VLDL-  
194 cholesterol and (IDL+LDL)-cholesterol and HDL-TG. Chol-C animals presented  
195 significantly higher levels of VLDL-cholesterol, (IDL+LDL)-cholesterol and



(IDL+LDL)-phospholipids, and lower concentrations of VLDL-TG, (IDL+LDL)-TG, HDL-TG and HDL-phospholipids than their C counterparts. Chol-S rats had lower VLDL-cholesterol and HDL-TG concentrations than Chol-C animals. Compared with S rats, Chol-S animals had higher VLDL-cholesterol, (IDL+LDL)-cholesterol, (IDL+LDL)-phospholipid and (IDL+LDL)-total lipids levels and lower VLDL-TG, (IDL+LDL)-TG, HDL-TG, HDL-phospholipid and HDL-total lipid values.

#### *Percentage contribution of lipids to lipoprotein composition*

**Figures 1a-1d** show the percentage contribution of the different lipids (% contribution) to the total VLDL, IDL+LDL and HDL lipid mass. A significant cholesterol x diet effect was observed for the percentage of cholesterol in VLDL. Cholesterol supplementation influenced the cholesterol, TG and phospholipid composition of VLDL. VLDL of C animals presented more phospholipids but less cholesterol than that VLDL from S rats. IDL+LDL fraction of S rats had proportionally more cholesterol but less TG than IDL+LDL of S rats. Chol-C and Chol-S animals presented VLDL and IDL+LDL particles enriched in cholesterol but decreased in TG with respect to VLDL and IDL+LDL of C and S animals, respectively. No significant differences were observed between the lipid percentage contribution in VLDL, IDL+LDL or HDL of Chol-C and Chol-S rats.

#### **DISCUSSION**

The present study shows for the first time that the consumption of diets enriched in RP containing sea spaghetti, with or without cholesterol supplementation, influences AE activity and the lipoprotein composition and profile in growing Wistar rats. In

221 agreement with previous studies, the consumption of alga decreased feed consumption,  
222 probably due to its high soluble fibre and fucoxanthin contents.<sup>9,30</sup> Rats on Chol-C and  
223 Chol-S displayed decreased growing rate.<sup>31</sup> When cholesterol was not added to the diet,  
224 the consumption of C and S maintained normal levels of cholesterol, TG and  
225 phospholipids in rats.<sup>10,13,17,32</sup> In addition, the cholesterol: phospholipid ratio remained  
226 below one in C and S rats, suggesting normocholesterolaemia.<sup>35</sup> The inclusion of the  
227 hypercholesterolaemic agent induced moderate hypercholesterolemia in agreement with  
228 previous studies.<sup>33-36</sup> Nonetheless, the Chol-S diet partially blocked those effects.  
229 Previous result suggest that not all seaweeds alone<sup>17</sup> or added to RP<sup>15</sup> decrease the  
230 hypercholesterolemic effect of dietary cholesterol. Some seaweed polysaccharides as  
231 sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan interact with dietary cholesterol  
232 to facilitate its excretion, whilst dietary agar was almost inactive.<sup>12,37</sup> RP-S, probably  
233 due to the algal compounds, improved the antioxidant status, increasing AE activity. AE  
234 activity increases in rats consuming pomegranate polyphenols<sup>38</sup> or seaweeds.<sup>10</sup> AE,  
235 which binds to HDL and other lipoproteins,<sup>39</sup> is involved inhibits lipoprotein  
236 peroxidation.<sup>23,24</sup> The same effect or tendency was observed when data were adjusted  
237 for cholesterol and HDL-cholesterol. The absolute lipid content and composition of  
238 IDL+LDL and HDL in C rats were comparable with those reported in  
239 normocholesterolemic rats.<sup>20,40</sup> HDL-cholesterol accounts for about 85% total  
240 cholesterol. Rats are known to display a very effective uptake of VLDL and a low  
241 transference of apoB from VLDL to LDL,<sup>41</sup> which explain the low LDL levels of  
242 normocholesterolemic rats.<sup>20,32,40,42</sup> In general terms, lipoprotein fractions composition  
243 were quite similar in C and S rats (Fig 1), although VLDL of S rats contained with  
244 respect to total lipids more TG and less phospholipids than the C-rats VLDL; the  
245 IDL+LDL fraction contained with respect to total lipids more cholesterol and less TG

1  
2  
3  
4 246 than the IDL+LDL fraction of the C-rats; HDL lipid composition of S and C groups  
5  
6 247 were similar. Differences between Chol-C and Chol-S in lipid and lipoprotein levels  
7  
8 248 must first be attributed to the different soluble fibre content of both diets and, secondly,  
9  
10 249 to other compounds, such as minerals and omega-3 fatty acids, which may also affect  
11  
12 250 lipaemia.<sup>10,17,42</sup> Consistent with other studies,<sup>34,35,43</sup> the Chol-C diet decreased  
13  
14 251 triglyceridemia and induced hypercholesterolaemia<sup>17,42,44</sup> with increased amounts of  
15  
16 252 lipids transported by VLDL and LDL fractions but reduced by the HDL fraction. In  
17  
18 253 fact, the average lipid composition of VLDL in CC rats (Fig 1), clearly suggest that  
19  
20 254 those lipoproteins were  $\beta$ -VLDL (VLDL very rich in cholesterol and poor in TG). The  
21  
22 255 Chol-S diet blocked the hypercholesterolaemic induction observed in the Chol-C diet.  
23  
24 256 The higher soluble fibre, polyphenols and phlorotannins of Sea Spaghetti may be  
25  
26 257 involved in those effects. These results were similar to those observed after adding  
27  
28 258 brown algae to high cholesterol diets.<sup>45</sup> The hypercholesterolaemic treatment increased  
29  
30 259 AE activity in Chol-C vs C rats, but unexpectedly, this was not observed after  
31  
32 260 consuming Chol-S diet with respect to S diet. Present results are similar to those  
33  
34 261 obtained in rats fed supplementary dietary cholesterol and RP enriched in Nori but  
35  
36 262 different from those of rats fed cholesterol and RP-Wakame diet, suggesting that  
37  
38 263 differences in algal compounds are responsible of such differences.<sup>16</sup> Low AE values in  
39  
40 264 Chol-S rats may be due to increased hepatic uptake of HDL in the reverse cholesterol  
41  
42 265 transport, as AE is primarily bound to HDL particles. It can also be hypothesized that  
43  
44 266 the increased plasma cholesterol may counterbalance the effects of Sea Spaghetti on AE  
45  
46 267 activity. Cholesterol is mainly eliminated from the body via cholic acid production.  
47  
48 268 Biosynthesis of cholic acid via cytochrome P450 increases the production of free radical  
49  
50 269 substances;<sup>46</sup> this effect was suggested for Wakame and Nori-enriched pork.<sup>47</sup>  
51  
52 270 Nonetheless, the results on AE are difficult to be explained and deserve further studies.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 271 TG levels of S rats tended to be lower than those of C rats. Murata *et al.*,<sup>48</sup> reported that  
5  
6 272 plasma and liver cholesterol levels decreased in rats given a diet containing a mixture of  
7  
8 273 fish and wakame for 4 weeks, whereas Yoon *et al.*,<sup>45</sup> reported that treatment with the  
9  
10 274 ethanol extracts of *E. Stolonifera* and its phlorotannin-rich fractions induced a  
11  
12 275 significant reduction in TG, plasma cholesterol, and LDL-cholesterol, as well as a  
13  
14 276 significant increase in the HDL-cholesterol of hyperlipidemic rats. Taking into account  
15  
16 277 the total lipids of VLDL, IDL+LDL and HDL fractions (Table 3) and the average lipid  
17  
18 278 composition of those fractions (Fig. 1), it can be deduced that Chol-S rats have  
19  
20 279 approximately 18% less HDL particles of equal composition than Chol-C rats. The  
21  
22 280 hepatic scavenger receptor B-I is engaged in the hepatic uptake of plasma HDL-  
23  
24 281 cholesterol for excretion into the bile.<sup>49,50</sup> This may explain the lower HDL-cholesterol  
25  
26 282 in Chol-C and Chol-S rats than in C and S counterparts. In addition Chol-S rats  
27  
28 283 presented 65% less  $\beta$ -VLDL particles than the Chol-C rats. Fibre and soluble fibre  
29  
30 284 contents of the diets together with other compounds, such as minerals and in minor  
31  
32 285 amount omega-3 fatty acids would contribute decreasing the  $\beta$ -VLDL synthesis and  
33  
34 286 secretion.<sup>10,17,34,35,48</sup> Finally, 45% less total lipids were transported by the IDL+LDL  
35  
36 287 fraction, suggesting that this abnormally increased fraction was reduced in rats fed RP-  
37  
38 288 S, probably influencing the uptake of VLDL by the liver and decreasing the conversion  
39  
40 289 of VLDL into LDL. Large VLDL (rich in TG) contributes less to the formation of LDL  
41  
42 290 than small VLDL (richer in cholesterol and poorer in TG) in rats and other animals.<sup>51</sup>

43  
44  
45  
46  
47  
48  
49 291 In conclusion, diets including Sea Spaghetti-enriched pork showed antioxidant  
50  
51 292 activity increasing AE activity with respect to control pork diet. The present results  
52  
53 293 suggest the convenience of consuming Sea Spaghetti-enriched pork in the frame of  
54  
55 294 cholesterol enriched diets. Future studies are needed to understand the relationship  
56  
57 295 between AE and cholesterol changes and the convenience of consuming large amounts  
58  
59  
60

296 and for long periods of Sea Spaghetti enriched pork in hypercholesterolaemic human  
297 subjects.

298

#### 299 **ACKNOWLEDGEMENTS**

300

301 The present study was supported by the Spanish projects AGL-2011-29644-C02-02 and  
302 Consolider-Ingenio 2010 project CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the  
303 predoctoral fellowship of the Universidad Complutense, Madrid, Spain to A S-M, that  
304 of the Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) from the  
305 Bolivarian Republic of Venezuela to R O-D. All authors have significantly contributed  
306 to the manuscript and agree with the present version of the paper. FJ S-M contributed to  
307 the study design, data discussion and writing of the manuscript. R O-D, A S-M., and S  
308 B. contributed to the data acquisition and analysis and writing of the manuscript. J B  
309 contributed to the data discussion and made a critical review of the manuscript.

310

#### 311 **AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT**

312 The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Hamm M: Meat as component of a balanced diet. *Fortschritte Der Medizin* 1991; 109:337–340.
2. Jiménez-Colmenero F, Ventanas J, Toldrá F: Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Sci* 2010;84:585-593.
3. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP: Iron status biomarkers in iron efficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem* 2009;65:165–174.
4. Sánchez-Muniz FJ: Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 2012;27:40-54.
5. Mahfouz MM, Kummerow FA: Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 2000;11:293–302.
6. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W: Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354:1234–1241.
7. Kotani K, Yamada T: Oxidative stress and metabolic syndrome in a Japanese female population. *Australas J Ageing* 2012;31:124-127.
8. Iwai K: Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice. *Plant Foods Hum Nutr* 2008;63:163–169.
9. Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA: Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol* 2012;23:83–96.



10. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ: Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food* 2009;12:236-258.
11. Cofrades S, López-López I, Bravo L, Ruiz-Capillas C, Bastida S, Larrea MT, Jiménez-Colmenero F: Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int* 2010;15:361-370.
12. Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz FJ: Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 2000;20:585-598.
13. Bocanegra A, Benedí J & Sanchez-Muniz FJ: Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 2006;95:696-702.
14. Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ: A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br J Nutr* 2008;99:272-280.
15. Schultz Moreira AR, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ: Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:290-298.
16. Olivero-David R, Schultz-Moreira A, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J, Sanchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ: Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br J Nutr* 2011;106:1476-1486.

17. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Nus M, Sánchez-Montero JM, Sánchez-Muniz FJ: Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br J Nutr* 2009;102:1728–1739.
18. Barter PJ, Rye KA: High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;121:1–12.
19. Shaish A, Harari A, Hananshvili L, Cohen H, Bitzur R, Luvish T, Ulman E, Golan M, Ben-Amotz A, Gavish D, Rotstein Z, Harats D: 9-Cis b-carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. *Atherosclerosis* 2006;189:215–221.
20. Wong KH, Sam SW, Cheung PCK, Ang PO: Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr Res* 1999;19:1519–1527.
21. Uchida Y, Maezawa Y, Uchida Y, Hiruta N, Shimoyama E, Kawai S: Localization of oxidized low-density lipoprotein and its relation to plaque morphology in human coronary artery. *PLoS One* 2013;8:e55188. doi: 10.1371/journal.pone.0055188.
22. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–126.
23. Canales A, Sánchez-Muniz FJ: Paraoxonase, something more than an enzyme? *Med Clin (Barc)* 2003;121:537–548.
24. Aviram M: Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1301–1303.
25. Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM: Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de un enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I (Arylesterase. Methodological and functional aspects of a key enzyme in cardiovascular disease. Part I). *An R Acad Nat Farm* 2007;74:5–27.



- 1  
2  
3  
4 26. Cofrades S, López-López I, Solas MT, Bravo L, Jiménez-Colmenero F: Influence of  
5  
6 different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-  
7  
8 salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci* 2008;79:767–776.  
9  
10  
11 27. López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz F,  
12  
13 Cofrades S, Jiménez-Colmenero F: Composition and antioxidant capacity of low-  
14  
15 salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* 2009;  
16  
17 83:492–498.  
18  
19  
20 28. Terpstra AH, Lapré JA, de Vries HT, Beynen AC: Hypocholesterolemic effect of  
21  
22 dietary psyllium in female rats. *Ann Nutr Metab* 2000;44:223–228.  
23  
24  
25 29. Nus, Meritxell I; Sánchez-Muniz, Francisco J. I; Gago, José V. 2 Nus M, Sánchez-  
26  
27 Muniz FJ, Sinisterra Gago JV, López-Oliva E, Sánchez-Montero, JM:  
28  
29 Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics. *Enzyme*  
30  
31 *Microb Technol* 2008;43: 252–256.  
32  
33 30. Gómez-Ordóñez, E, Jimenez-Escrig A, Ruperez P: Dietary fibre and  
34  
35 physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern  
36  
37 Spanish coast. *Food Res Int* 2010;43:2289–2294.  
38  
39  
40 31. Beck EJ, Tapsell LC, Batterham MJ, Tosh SM, Huang XF: Oat beta-glucan  
41  
42 supplementation does not enhance the effectiveness of an energy-restricted diet in  
43  
44 overweight women. *Br J Nutr* 2010;103:1212–1222.  
45  
46  
47 32. Thiruchenduran M, Vijayan NA, Sawaminathan JK, Devaraj SN: Protective effect  
48  
49 of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced  
50  
51 hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:361–368.  
52  
53  
54 33. Jacques H: Effects of dietary fish proteins on plasma cholesterol and lipoproteins in  
55  
56 animal models and in humans. In *Dietary Proteins, Cholesterol Metabolism and*  
57  
58  
59  
60

- Atherosclerosis. (M Sugano and AC Beynen, editors) Basle: Karger Basel, 1990, pp. 59–70.
34. Chiang MT, Chen YC, Huang AL: Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:328–334.
35. Sánchez-Muniz FJ, Higón E, Cava F, Viejo JM: Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J Agric Food Chem* 1992;40:2226–2231.
36. Terpstra AH, Lapré JA, de Vries HT, Beynen AC: Hypocholesterolemic effect of dietary psyllium in female rats. *Ann Nutr Metab* 2000;44:223–228.
37. Ren D, Noda H, Amano H, Nishino T, Nishizawa K: Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish Sci* 1994;60:83–88.
38. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M: Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005;180:55–61.
39. Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, Levy AP, Elias M, Aviram M: Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J Agric Food Chem* 2008;56:8704–8713.
40. Garrido-Polonio C, García-Linares MC, García-Arias MT, López-Varela S, García-Fernández MC, Terpstra AH, Sánchez-Muniz FJ: Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br J Nutr* 2004;92:257–265.
41. Sigurdsson G, Nicoli A, Lewis B: Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *J Clin Invest* 1975;56:1481–1490.

42. Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, Bastida S, Viejo J: Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolaemic rats. *J Nutr* 2003;133:2302–2308.
43. Fukushima M, Ohhashi T, Ohno S, Saitoh H, Sonoyama K, Shimada K, Sekikawa M, Nakano M: Effects of diets enriched in n-6 or n-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* 2001;36:61–266.
44. Viejo J, García-Linares C, Bastida S, Sanchez-Muniz, FJ: Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int* 2003;9:329–338.
45. Yoon NY, Kim HR, Chung HY, Choi JS: Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Arch Pharm Res* 2008;12:1564-1571.
46. Cadenas E, Davis KJ: Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med* 2000;29:222-230.
47. Schultz Moreira, Adriana R, Benedí J, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz F: Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem* 2011;129:1623-1630.
48. Murata M, Sano Y, Ishihara K, Uchida M: Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J Nutr* 2001;132:742–747.
49. Mardones P, Quiñones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE, Rigotti A: Hepatic cholesterol

- and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:170–180.
50. Zhou H, Li Z, Silver LD, Jiang XC: Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:1482–1488.
51. Havel RJ: The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res* 1984; 25:1570–1576.

**TABLE 1** Composition of the Control, cholesterol-added Control, Sea Spaghetti and cholesterol-added Sea Spaghetti experimental diets<sup>1</sup>

	Non-added cholesterol diet		Added cholesterol diet	
	Control	Sea Spaghetti	Control	Sea Spaghetti
Diet AIN-93M				
Casein	127.5	127.5	127.5	127.5
Maize starch	382.75	382.75	362.35	362.35
Dyetrose <sup>2</sup>	131.75	131.75	131.75	131.75
Sucrose	85	85	85	85
Microcrystalline cellulose	42.50	42.50	42.50	42.50
Salt mix n° 210050 <sup>3</sup>	29.75	29.75	29.75	29.75
Vitamin mix n° 10025 <sup>4</sup>	12.16	12.16	12.16	12.16
L-Cystine	1.53	1.53	1.53	1.53
Choline bitartrate	3.06	3.06	3.06	3.06
t-Butylhydroquinone	0.0068	0.0068	0.0068	0.0068
Soyabean oil	34	34	34	34
Cholesterol			17	17
Cholic acid			3.4	3.4
Pork (freeze-dried) <sup>5</sup>				
Control restructured pork <sup>5</sup>	150		150	
Sea Spaghetti restructured pork <sup>5</sup>		150		150

<sup>1</sup>Ingredients (g/kg). <sup>2</sup>Dyetrose (carbohydrate composition) (g/kg): monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900. For salt mix and vitamin mix composition see materials and methods section. <sup>3</sup>AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate·H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide,

24.00; ferric citrate U·S·P, 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate· 4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate·9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate·12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. <sup>4</sup>AIN-93 M vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1 %), 2.50; vitamin A palmitate, (500 000 IU/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (400 000 IU/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23. <sup>5</sup>Protein (g), fat (g), minerals (g) (ash) and fibre (g) present in the 150g of control pork-, Sea Spaghetti freeze-dried restructured-pork; Control pork: 76.99, 51.52, 15.61 and 4 (microcrystalline cellulose), respectively; restructured meat with Sea Spaghetti: 73.94, 53.10, 17.40.

**Table 2**•Plasma cholesterol, triglycerides, phospholipids, total lipid, cholesterol/phospholipid, arylesterase activity (AE), AE/cholesterol and AE/HDL-c ratio, of rats fed that consuming control restructured pork and restructured pork with Sea Spaghetti with cholesterol or non-cholesterol-added to the pork meat experimental diets

	Added cholesterol	Control (C and Chol-C)	Sea Spaghetti (S and Chol-S)	Cholesterol effect	Diet effect	interaction
Total cholesterol (mg/dL) <sup>†</sup>	No Yes	59.6±16.4 236.9±59.0 <sup>***</sup>	60.8±6.5 120.7±41.3 <sup>c**</sup>	< .001	< .001	< .001
Triglycerides (mg/dL) <sup>†</sup>	No Yes	62.1±14.4 28.0±5.3 <sup>***</sup>	53.4±11.4 24.0±9.5 <sup>***</sup>	< .001	NS	NS
Phospholipids (mg/dL) <sup>†</sup>	No Yes	104.4±20.1 86.2±140.3	100.3±10.6 61.7±18.1 <sup>c***</sup>	< .001	< .05	< .001
Total lipids (mg/dL) <sup>‡</sup>	No Yes	226.1±46.9 279.1±75.9 <sup>***</sup>	214.4±21.5 206.4±56.5 <sup>a</sup>	< .001	< .001	< .001
Cholesterol/ phospholipids	No Yes	0.56±0.05 2.75±0.52 <sup>***</sup>	0.61±0.09 2.00±0.66 <sup>c***</sup>	< .001	< .001	< .001
Arylesterase (U/L)	No Yes	10.4±2.8 74.1±38.0 <sup>**</sup>	50.4±42.4 26.7±9.1 <sup>b*</sup>	.107	.761	.001
AE/total cholesterol (U/mg)	No Yes	0.02±0.00 0.04±0.02 <sup>*</sup>	0.09±0.09 0.03±0.01 <sup>b*</sup>	.151	.133	.049
AE/HDL- cholesterol (U/mg)	No Yes	0.02±0.02 0.19±0.01 <sup>**</sup>	0.10±0.09 0.07±0.03 <sup>b</sup>	.050	.517	.010

Data are Mean and SD of 10 animals per group. C, control; Chol-C, cholesterol-added control; S, Sea Spaghetti; Chol-S, cholesterol-added Sea Spaghetti. C and Chol-C data bearing a letter (c,  $P < .05$ ; b,  $P < .01$ ; a,  $P < .001$ ) significantly different from S and Chol-S, respectively. Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ . <sup>†</sup>To transform mg/dL in mmol/L of cholesterol, triglycerides and phospholipids, divide data by the molecular mass 38.7, 89.0 and 75.0, respectively. <sup>‡</sup>Cholesterol + triglycerides + phospholipids. One unit of AE was defined as the mmol phenol formed from phenyl acetate per min.



**Table 3.** Lipoprotein lipid concentration in plasma of rats fed that consuming Control restructured pork and restructured pork with Sea Spaghetti with cholesterol or non cholesterol-added in the experimental diets

		Added cholesterol	Control (C and Chol-C)	Sea Spaghetti (S and Chol-S)	Cholesterol effect	Diet effect	Interaction
Cholesterol (mg/dL)	VLDL	No	4.2±1.9	3.2±1.0			
		Yes	52.7±44.4*	15.5±10.7 <sup>c**</sup>	< .001	< .05	< .05
	IDL+LDL	No	1.2±0.6	2.2±1.1			
		Yes	117.5±34.3***	62.5±39.4 <sup>c***</sup>	< .001	NS	< .05
	HDL	No	53.5±14.2	54.4±9.4			
		Yes	52.3±24.7	37.6±22.5	< .001	< .05	NS
Triglycerides (mg/dL)	VLDL	No	32.2±12.3	30.2±11.0			
		Yes	8.2±4.8***	6.4±6.3***	< .001	NS	NS
	IDL+LDL	No	5.9±1.8	3.7±1.8 <sup>c</sup>			
		Yes	2.8±0.8***	2.7±2.4*	NS	NS	NS
	HDL	No	20.8±2.6	17.9±5.5			
		Yes	17.5±2.1*	14.6±5.2*	< .05	NS	NS
Phospholipids (mg/dL)	VLDL	No	10.2±4.6	4.9±1.6 <sup>c</sup>			
		Yes	21.2±8.0*	7.3±5.8 <sup>c</sup>	< .05	< .05	NS
	IDL+LDL	No	1.5±0.6	2.4±2.4			
		Yes	21.0±6.1***	16.3±8.4***	< .001	NS	NS
	HDL	No	90.0±16.4	89.9±10.4			
		Yes	41.8±13.1***	36.1±8.8***	< .001	NS	NS
Total lipids <sup>‡</sup> (mg/dL)	VLDL	No	46.6±16.3	38.3±13.1			
		Yes	82.9±23.1	29.2±20.3 <sup>c</sup>	NS	NS	NS
	IDL+LDL	No	8.6±2.2	8.2±2.8			
		Yes	148.7±47.1***	81.5±43.8 <sup>b***</sup>	< .001	< .05	NS
	HDL	No	164.3±28.7	162.2±20.7			
		Yes	107.3±34.1**	88.3±29.1***	< .001	NS	NS

Data are Mean and SD of 10 animals per group. C, control; Chol-C, cholesterol-added control; S, Spaghetti; Chol-S, cholesterol-added Sea Spaghetti. C and Chol-C data bearing a letter (c,  $P < .05$ ; b,  $P < .01$ ; a,  $P < .001$ ) were significantly different from S and Chol-S, respectively. Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ .

<sup>‡</sup>Cholesterol + triglycerides + phospholipids. † To transform mg/dL in mmol/L of cholesterol, triglycerides and phospholipids, divide data by the molecular mass 38.7, 89.0 and 75.0, respectively.



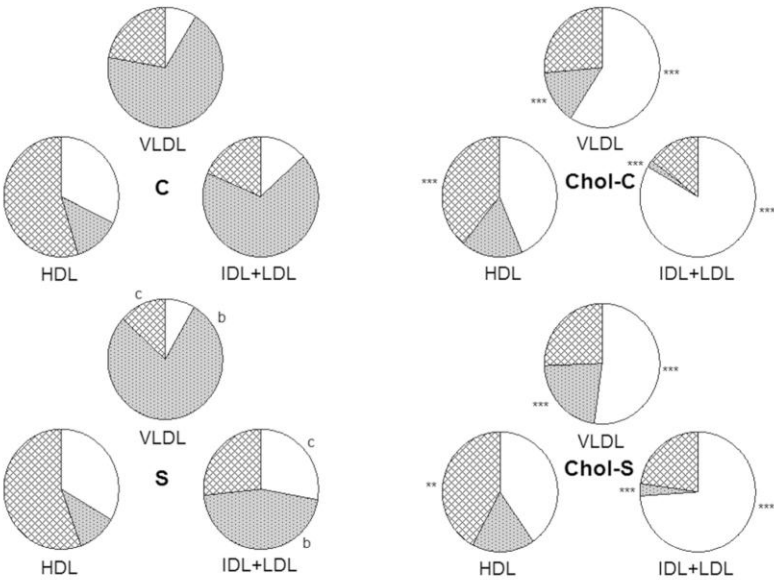





Figure 1

Figure  
254x190mm (96 x 96 DPI)

**Foot-notes to Figures.**

**Figure 1.** Percentage of contribution of the different lipids to the total mass of the VLDL, IDL+LDL and HDL in rats fed the control-restructured pork (RP) and the Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*)-RP experimental diets with and without supplementary cholesterol. C, Control-RP; Chol-C, Cholesterol-added Control-RP; S, Sea Spaghetti-RP; Chol-C, Cholesterol-added Sea-Spaghetti-RP.

Sectors for the same parameter bearing a letter (c,  $P < .05$ ; b,  $P < .01$ ) in the S group were significantly different from those of C rats.  $**P < .01$ ;  $***P < .001$ , sectors for the same parameter in Chol-C and Chol-S groups bearing asterisks were significantly different from their no supplementary cholesterol C and S groups, respectively. Contribution (%) to the total lipid content in the lipoproteins of  cholesterol;  triglycerides; and  phospholipids.

### 5.3. PUBLICACIÓN N° 3.

**Plant Foods in Human Nutrition** (2010) 65:290–298. **ISI Web. JCR. (2010).** Índice impacto: 2.463 (19 de 126 en Food Science & Technology)

**Dietas de reestructurados cárnicos con Wakame y Nori enriquecidas con colesterol afectan la expresión génica y actividad de enzimas antioxidantes en ratas Wistar**

Adriana Schultz Moreira; Laura González-Torres; Raul Olivero-David; Sara Bastida; Juana Benedi; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Se testaron los efectos de las dietas incluyendo reestructurados cárnicos (RC) con alga Wakame o Nori sobre los niveles de glutatión hepático total, y varias expresiones génicas y actividades de enzimas antioxidantes. Seis grupos de diez ratas Wistar macho en crecimiento fueron utilizadas y alimentadas durante 35 días con una mezcla de 85% de dieta AIN-93M y 15% de RC liofilizado. El grupo de control (C), consumió RC control; los grupos Wakame (W), y Nori (N), consumieron CR con 5% de Wakame y 5% de Nori, respectivamente. Los animales que recibieron las dietas con colesterol añadido (CC, CW, y CN) ingirieron respectivamente las dietas basales con colesterol (2%) y ácido cólico (0,4%) añadido. La presencia de alga y el colesterol dietético interaccionan de forma significativa ( $p < 0,002$ ) sobre la expresión génica; sin embargo, no se observó esa interacción de forma significativa en las actividades enzimáticas. El suplemento del colesterol disminuyó los valores de la mayor parte de las expresiones génicas y actividades de las enzimas antioxidantes ensayadas. En W-RC vs. C-RC, la expresión génica de GPx, GR, Mn-SOD, y Cu, Zn-SOD se incrementó ( $p < 0,05$ ), pero disminuyó la de la catalasa. En el lote N-RC vs. C-RC ( $p < 0,05$ ) se incrementó la expresión génica de la catalasa y Mn-SOD. Actividad de la GR aumentó en las ratas W-RC mientras incrementó la actividad SOD, y disminución de la Se-GPx N en animales. La dieta W-RC incrementó el glutatión total y reducido, y disminuyó el índice redox. La dieta CN induce niveles significativamente más bajos de colesterol en el plasma ( $p < 0,001$ ) que la dieta CW. En conclusión, Nori-RC resultó ser un alimento hipocolesterolémico mientras que Wakame-RC un alimento antioxidante. Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta cuando se incluya este tipo de RC como alimento potencialmente funcional en humanos.

## Wakame and Nori in Restructured Meats Included in Cholesterol-enriched Diets Affect the Antioxidant Enzyme Gene Expressions and Activities in Wistar Rats

Adriana Schultz Moreira · Laura González-Torres ·  
 Raul Olivero-David · Sara Bastida · Juana Benedi ·  
 Francisco J. Sánchez-Muniz

Published online: 30 July 2010  
 © Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** The effects of diets including restructured meats (RM) containing Wakame or Nori on total liver glutathione status, and several antioxidant enzyme gene expressions and activities were tested. Six groups of ten male growing Wistar rats each were fed a mix of 85% AIN-93 M diet and 15% freeze-dried RM for 35 days. The control group (C) consumed control RM, the Wakame (W) and the Nori (N) groups, RM with 5% Wakame and 5% Nori, respectively. Animals on added cholesterol diets (CC, CW, and CN) consumed their corresponding basal diets added with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%). Alga and dietary cholesterol significantly interact ( $P<0.002$ ) influencing all enzyme expressions but not activities. The cholesterol supplement decreased most enzyme expression and activity. W-RM vs. C-RM increased ( $P<0.05$ ) expression of GPx, GR, Mn-SOD, and Cu,Zn-SOD and decreased that of catalase. N-RM vs. C-RM increased ( $P<0.05$ ) expression of catalase and Mn-SOD. GR activity increased in W-RM rats

while SOD activity increased, but that of Se-GPx decreased in N animals. W-RM increased total and reduced glutathione and decreased the redox index. CN diet induced significantly lower plasma cholesterol levels ( $P<0.001$ ) than the CW diet. In conclusion, Nori-RM is a hypocholesterolemic food while Wakame-RM is an antioxidant food. This should be taken into account when including this kind of RM as potential functional foods in human.

**Keywords** Nori · Wakame · Functional meats · Antioxidant enzymes · Glutathione · Gene-expression

### Introduction

Meat and meat products, which concentrate and supply a large number of valuable nutrients -protein, fat, vitamins, and minerals-, have traditionally been basic components of the human diet. However, epidemiological associations between consumption of meat and meat derivatives and some of the major degenerative diseases such as coronary heart disease (CHD), cancer, high blood pressure, and obesity have influenced nutritional thinking and dietary guidelines over the last few years [1]. For this reason, the meat industry is presently employing various strategies to introduce qualitative and/or quantitative modifications in meat and/or meat derivatives to create “functional” products [1, 2].

Most physiologically active substances come from plants, and combined with other foods such as meat derivatives can transform them in functional foods. Consumption of marine algae, which are a traditional component of the Asian diet, has increased considerably in the Western world over the last decade [3]. Some species of

A. S. Moreira · L. González-Torres · R. Olivero-David ·  
 S. Bastida · F. J. Sánchez-Muniz (✉)  
 Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición),  
 Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
 Plaza Ramón y Cajal s/n,  
 28040 Madrid, Spain  
 e-mail: frasan@farm.ucm.es

R. Olivero-David  
 Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología,  
 Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá,  
 Alcalá de Henares,  
 Madrid, Spain

J. Benedi  
 Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia,  
 Universidad Complutense de Madrid,  
 Madrid, Spain

*Undaria* and *Porphyra* contain high levels of fiber, several minerals, and vitamins, and their lipid content is normally <1.0%. Furthermore, those seaweeds have recently been reported to contain several minor compounds with beneficial biological activities [4]. Hypercholesterolemia is associated with increased oxidative stress in animals [5] and humans [6], which in turn has been linked to degenerative diseases such as atherosclerosis. It has been suggested that increased dietary intake of antioxidants may reduce the progression of these diseases [7]. Our group has tested the effect of diets containing Nori and Konbu on the antioxidant status of Wistar rats consuming high dietary levels of cholesterol [8].

However, no studies are available on the effect of diets enriched in restructured meat (RM) containing algae on the antioxidant status. The inclusion of alga in meat would have a double-edged effect because meat is rich in iron, and high levels of this metal are known to increase oxidative stress [9]. Due to the growing demand for alternative treatments for CHD, this study given a dietary cholesterol supplement aimed to investigate the effect of diets enriched in restructured pork meat containing Wakame and Nori for five weeks on antioxidant substrate concentrations and antioxidant enzyme activities and gene expression in growing Wistar rats.

## Materials and Methods

### Restructured Meat Preparation

Meat raw materials (post-rigor pork meat and pork backfat), seaweeds: Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Nori (*Porphyra umbilicalis*), and additives (sodium chloride, sodium tripolyphosphate (STP) and sodium nitrite) were used. Fresh marine seaweeds were collected on the Atlantic coast, dried in the shade and packed in polyethylene plastic bags for commercial distribution (Algamar C.B., Redondela, Pontevedra, Spain). These seaweeds were ground in a mill (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Germany), passed through a screen with an aperture of 0.25 mm and stored in plastic flasks at 4±2 °C until used. Details of the RM preparation and composition have been already published [2]. Briefly, raw meat material was homogenized and ground for 1 min in a chilled cutter (2 °C) (Stephan Universal Machine UM5, Stephan, Söhne GmbH and Co., Hameln, Germany). All the fat and half of the seaweeds, NaCl (2.0% for control samples and 0.5% for samples with added seaweed), STP and sodium nitrite were added to the ground meat and the whole was mixed for 1 min; then the rest of the ingredients were added and the mixture homogenized for 1 min. Finally, the whole meat batter was homogenized under vacuum for 2 min. Each sample was prepared in

duplicate. N-RM and W-RM contained lower Na than the C-RM (385.5, 626.7 and 873.8 mg/100 g RM, respectively). As stated in that article [2], this was the result of using less NaCl in the formulations, because the use of seaweeds helped to overcome technological problems associated with low-salt products [2].

### Animals and Treatments

Sixty male growing Wistar rats with a body weight of approximately 90 g at the outset were obtained from Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona (Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room (22.3±18 °C) with a 12 h light–dark cycle. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2005-07204-C02-01/ALAI) and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). After weaning, rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) during a 1-week period of adaptation to environmental conditions and then distributed into six groups of 19 animals each, according to average body weight. Experimental diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 4.2% total dietary fiber. Water and food were provided *ad libitum* over the 5-week experimental period. Six experimental semi-synthetic diets (Table 1) were prepared: (a) the control diet (C) contained 85% rodent feed (AIN-93 M, purified rodent diet; Dyets #180729, DYETS, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 15% freeze-dried control pork meat to which 4% cellulose had been added; (b) the Wakame diet (W) consisted of a mixture of AIN-93 M #180729 feed (85%) and freeze-dried restructured Wakame meat (15%); (c) the Nori diet (N) consisted of a mixture of AIN-93 M #180729 feed (85%) and freeze-dried restructured Nori meat (15%); (d) the cholesterol control diet (CC) was identical to the C diet but with 2% cholesterol (95%–98% purity) and 0.4% cholic acid (>98% purity) substituting an equal amount of starch (AIN-93 M # 180730 diet); (e) the cholesterol-Wakame diet (CW) was the Wakame diet enriched with cholesterol and cholic acid, and (f) the cholesterol-Nori diet (CN) consisted of the Nori diet enriched with cholesterol and cholic acid.

Food intake was checked daily and body-weight variations were measured on alternate days. At the end of the experiment, the rats were sacrificed by cervical dislocation. Blood was collected and processed for the biochemical estimations. Liver tissue (0.5 g) was homogenized in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), and centrifuged at 6,500 rpm (3,800g) at 4 °C for 20 min. All spectrophotometric measurements were carried out in an Uvikon 930 UV spectrophotometer (Kontron Instruments, Munich, Germany).



**Table 1** Composition of the Control, Wakame (*Undaria pinnatifida*), and Nori (*Porphyra umbilicalis*), normocholesterolaemic and hypercholesterolaemic experimental diets<sup>a</sup>

	Non-added cholesterol diet		Added cholesterol diet	
	Control	Nori or Wakame	Control	Nori or Wakame
Diet AIN-93 M				
Casein	127.5	127.5	127.5	127.5
Maize starch	382.75	382.75	362.35	362.35
Dyetrose <sup>b</sup>	131.75	131.75	131.75	131.75
Sucrose	85	85	85	85
Microcrystalline cellulose	42.50	42.50	42.50	42.50
Salt mix n° 210050 <sup>c</sup>	29.75	29.75	29.75	29.75
Vitamin mix n° 10025as <sup>d</sup>	12.16	12.16	12.16	12.16
L-Cystine	1.53	1.53	1.53	1.53
Choline bitartrate	3.06	3.06	3.06	3.06
t-Butylhydroquinone	0.0068	0.0068	0.0068	0.0068
Soybean oil	34	34	34	34
Cholesterol			17	17
Cholic acid			3.4	3.4
Pork meat (freeze-dried) <sup>e</sup>				
Control-meat <sup>e</sup>	150		150	
Wakame-meat <sup>e</sup> or Nori-meat <sup>e</sup>		150		150

<sup>a</sup> Ingredients (g/kg)<sup>b</sup> Dyetrose (carbohydrate composition) (g/kg): monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900<sup>c</sup> Mineral mix contained AIN-93 M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate-H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P, 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate-9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate-12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806<sup>d</sup> AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1%), 2.50; vitamin A palmitate (500 000 IU/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (400 000 IU/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23<sup>e</sup> Protein (g), fat (g), minerals (g) (ash) and fibre (g) present in the 150 g of Control, Wakame and Nori freeze-dried restructured-meats; Control meat: 76.99, 51.52, 15.61 and 4 (microcrystalline cellulose), respectively; Nori-meat: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.0, respectively; Wakame-meat: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.45

## Enzymes Assays

Liver glutathione reductase (GR) activity (nmol NADPH/min/per mg protein) was assessed by following the rate of reduction of NADP<sup>+</sup> to NADPH in the presence of oxidized glutathione (GSSG) by the method of Barga de Quiroga et al. [10]. Glutathione peroxidase (GPx) activity (nmol NADPH/min/per mg protein) was determined as Se-dependent GPx and total GPx activities. Se-dependent GPx activity was assessed, using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate and including azide as catalase inhibitor, by the method of Paglia and Valentine [11]. Total GPx activity was measured, using cumene hydroperoxides, according to the Lawrence and Burk method [12]. Catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in absorbance at 240 nm using hydrogen peroxide as substrate [13]; one CAT unit is defined as the amount of enzyme that

transforms 1 μmol of hydrogen peroxide per minute at 25 °C. Catalase activity was expressed as international units per milligram protein. Total superoxide dismutase activity (SOD) was determined using the method described by Marklund [14], based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radicals. SOD activity was expressed as international units per milligram protein. Liver protein concentrations were determined using bovine serum albumin as the standard, by the Bradford method [15].

## Glutathione Status and Lipid Peroxide Assay

Reduced glutathione (GSH) content was determined using a slight modification of the Hissin and Hilf method [16], in which GSH was sequentially oxidized by o-phthalaldehyde and reduced by NADPH in the presence of GR. The

oxidized glutathione level (GSSG) was determined by masking GSH with N-ethylmaleimide. Glutathione values were expressed as  $\mu\text{g}$  of GSH and GSSG per mg protein. The redox index was calculated as the GSSG/total glutathione ratio. Aliquots of the homogenate were collected and immediately tested for lipid peroxidation as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according to the Mihara and Uchiyama method [17]. Liver TBARS concentrations were expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of protein.

#### Plasma Cholesterol

Plasma cholesterol levels were determined using the standard enzymatic colorimetric method of SPINREACT (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).

#### RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from frozen liver samples following the guanidinium thiocyanate/phenol reagent method [18].  $\beta$ -actin cDNA was used as an internal control.

The sequences of the primers were as follows:

Catalase sense: 5' GTGAGAACATTGCCAACCAC 3'; Catalase antisense: 5' CTCGGGAAATGTCATCAAAAG 3'; Mn-SOD sense: 5' GACAAACCTGAGCCCTAAGGG 3'; Mn-SOD antisense: 5' CTTCTTGCAAACCTATG 3'; Cu, Zn-SOD sense: 5' GCCGTGTGCGTGCTGAA 3'; Cu, Zn-SOD antisense: 5' TGACGATGCCGTGCTGCATG 3'; GPx sense: 5' CCAATCAGTTCCGACACCAG 3'; GPx antisense: 5' AAAGTTCCAGGCAATGTCTG 3'; GR sense: 5' TCACTGCTCCGCACATCC 3'; GR antisense: 5' CTCAACACCGCCAGCGTTCTCC 3';  $\beta$ -actin sense: 5' TACAACCTCCTTGACAGCTCC 3';  $\beta$ -actin antisense: 5' GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC 3'.

Amplification products were resolved by electrophoresis on a 1.8% agarose gel containing 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide. The gel was then photographed under UV transillumination. The PCR bands on the photograph of the gel were scanned for quantification using a densitometer linked to a computer analysis system. Net band intensity (background-subtracted intensity) was normalized to  $\beta$ -actin values and plotted as arbitrary unit [19].

#### Statistical Analyses

Results are expressed as mean values and standard deviations. The present study was designed to have a power of 80% to detect a 20% relative difference between the two meat-diet consumptions in plasma cholesterol levels or Zn, Cu SOD expression. A pooled SD of 15% of data variability was assumed for this calculation. Two-way ANOVA (cholesterol and alga) followed by *post hoc* studies were performed to analyze the effect of each factor. The alga effect was checked by one-way ANOVA followed by the Bonferroni test, while the cholesterol effect was analyzed by the Student *t*-test. Results were considered significant at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were conducted using the SPSS version 15.0 statistical analysis packages (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### Results

##### Food Ingestion, Body Weight and Liver Weight

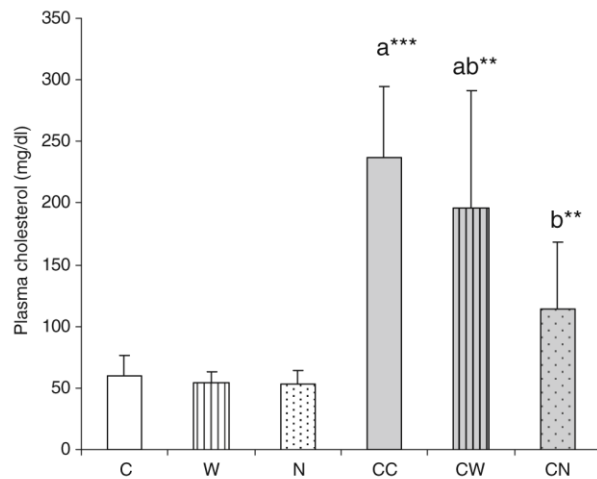
Table 2 shows the effect of alga and dietary cholesterol on food ingestion, body weight, and liver weight. Significant

**Table 2** Effect of a cholesterol and non-cholesterol-enriched diets containing restructured meat with Wakame or Nori on food intake, body-weight gain, liver weight and hepatosomatic index of Wistar rats<sup>a</sup>

	Added cholesterol	Control meat diets (C, CC)	Wakame-meat diets (W, CW)	Nori-meat diets (N, CN)	ANOVA		
					Diet effect	Cholesterol effect	Diet $\times$ Cholesterol interaction
Food Intake (g/d)	No	19.09 $\pm$ 1.31a	19.31 $\pm$ 0.96b	17.90 $\pm$ 1.19a	0.801	<0.001	<0.001
	Yes	21.21 $\pm$ 1.22a ***	21.13 $\pm$ 1.44a**	22.9 $\pm$ 1.12b***			
Body-weight gain (g)	No	192.0 $\pm$ 16.0a	185.1 $\pm$ 18.9ab	172.8 $\pm$ 13.5b	0.407	0.433	0.009
	Yes	184.3 $\pm$ 19.2	170.2 $\pm$ 15.5	190.2 $\pm$ 14.1*			
Liver weight (g)	No	8.93 $\pm$ 0.51	8.68 $\pm$ 1.06	8.64 $\pm$ 1.08	0.269	<0.001	0.161
	Yes	16.9 $\pm$ 2.89 ***	16.47 $\pm$ 2.05 ***	18.3 $\pm$ 2.0***			
Hepatosomatic index <sup>b</sup>	No	2.87 $\pm$ 0.24	2.85 $\pm$ 0.26	2.96 $\pm$ 0.32	0.482	<0.001	0.815
	Yes	5.51 $\pm$ 0.65***	5.63 $\pm$ 0.48 ***	5.77 $\pm$ 0.63***			

<sup>a</sup> Values (mean  $\pm$  SD,  $n=10$ ) in the same row bearing different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Values for the same diet but with different cholesterol contents bearing asterisks were significantly different (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). C, control group; W, Wakame group; N, Nori group. CC, CW, and CN consumed C, W, N basal diets enriched with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%)

<sup>b</sup> 100\*liver weight (g)/bodyweight (g)



**Fig. 1** Effect of cholesterol and non-cholesterol enriched diets containing restructured meat with Wakame or Nori on plasma cholesterol of Wistar rats. Values (mean  $\pm$  SD,  $n=10$ ) in the same dietary cholesterol level bearing different letters were significantly different ( $P<0.05$ ). Values for the same diet but with different cholesterol content bearing asterisks were significantly different (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). C, control group; W, Wakame group; N, Nori group. CC, CW, and CN consumed C, W, N basal diets enriched with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%)

interactions were observed on food intake and body weight gain. Cholesterol in the diet significantly affected food intake, liver weight ( $P<0.001$ ), and the hepatosomatic index (all,  $P<0.001$ ). Body weight decreased in the N group ( $P<0.05$ ) vs. C group.

#### Plasma Cholesterol Levels

Figure 1 shows the effect of alga and dietary cholesterol on plasma cholesterol levels. Significant alga  $\times$  cholesterol interaction ( $P=0.001$ ) was observed. Cholesterol in the diet significantly increased plasma cholesterol levels in CC ( $P<0.001$ ), CW, and CN (both  $P<0.01$ ) animals. CN rats showed significantly ( $P<0.001$ ) lower cholesterol levels than CC rats.

#### Liver Antioxidant Enzyme Activities and Expression

Table 3 shows the influence of alga and dietary cholesterol on the different enzyme activities and expression assayed. Non significant alga  $\times$  dietary cholesterol in diet interactions was observed. However, dietary cholesterol significantly affected all parameters except catalase activity. Compared to the C diet, the W diet produced higher ( $P<0.05$ ) GR activity while the N diet increased total GPx, GR, and SOD activities (at least  $P<0.05$ ). Supplementary cholesterol in the diet significantly decreased the activity of total GPx ( $P<0.001$ ), Se-dependent GPx ( $P<0.001$ ), and

SOD ( $P=0.001$ ) in the N group and Se-dependent GPx ( $P<0.01$ ), GR ( $P<0.01$ ), and SOD ( $P<0.001$ ) in the W group.

Gene expression of CAT, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD GPx, and GR in liver homogenate, expressed in arbitrary units, is also included in Table 3. Representative gene expression profiles of the C, W, N, CC, CW, and CN groups assayed by RT-PCR analysis are presented in Fig. 2. The expression of all enzymes was significantly affected ( $P<0.001$ ) by the alga  $\times$  dietary cholesterol interaction. W diet significantly increased GPx and GR expression (at least  $P<0.001$ ) and decreased that of catalase ( $P<0.01$ ) while the N diet increased catalase and Mn-SOD expression (both  $P<0.001$ ) with respect to C diet. CC diet produced lower catalase, Cu,Zn-SOD, and GR expression (all  $P<0.001$ ) but higher Mn-SOD ( $P<0.001$ ) and GPx ( $P<0.05$ ) expression than the C diet. CW diet produced lower GPx and GR expression (both  $P<0.001$ ) and higher Mn-SOD ( $P<0.001$ ) expression than W diet. Animals given the CN diet showed lower catalase, Mn-SOD and GPx, but higher GR expression than their CC counterparts while lower catalase, and higher Mn-SOD, Cu,Zn-SOD and GR expression (at least  $P<0.05$ ) than their CW counterparts.

#### Glutathione Status and TBARS Concentrations

Table 4 shows the concentrations of GSH, GSSG, and total glutathione, the redox index, and TBARS levels. Non-significant alga  $\times$  dietary cholesterol interaction was observed on these parameters. W diet produced higher total glutathione ( $P<0.05$ ) and GSH ( $P<0.01$ ) levels and lower redox index value ( $P<0.05$ ) than C diet. N diet did not affect any of these parameters. Inclusion of cholesterol in the diet significantly decreased GSH ( $P<0.001$ ) and increased GSSG concentrations, the redox index and TBARS levels (all  $P<0.001$ ). CW rats presented higher total glutathione and GSH values and a lower redox ratio ( $P<0.05$ ) than CC rats.

#### Discussion

Functional foods have been designed to improve lipoprotein profile [3, 4, 20] and antioxidant status [8, 21]. Present data suggest that consumption of alga-enriched RM offers protection against CHD, although the mechanisms involved vary depending on the kind of alga employed. While acceptance of the W and N diets compared favorably to that of the C diet, rats that consumed the N diet displayed a non-significant 9% lower body weight than those given the C diet. Wong et al. [22] reported that seaweed-fed rats and controls displayed similar food intake rates. Algae could be useful components of hypocaloric diets. Oben et al. [23] found that 1 fl oz/day of an oral infusion of ProAlgaZyme



**Table 3** Effect of cholesterol and non cholesterol-enriched diets containing restructured meat with Wakame or Nori on enzymes antioxidant activities and expression in liver homogenates of Wistar rats<sup>a</sup>

	Added cholesterol	Control meat diets (C, CC)	Wakame-meat diets (W, CW)	Nori-meat diets (N, CN)	ANOVA		
					Diet effect	Cholesterol effect	Diet × Cholesterol interaction
Se-dependent GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	No	2151±214	2380±373	2423±358	0.101	<0.001	0.279
	Yes	1666±201***	1893±274**	1654±396***			
Total GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	No	2547±261a	2778±461ab	3160±500b	0.010	<0.001	0.148
	Yes	2079±384***	2452±486	2316±352***			
Se-dependent GPx/Total GPx	No	0.85±0.06a	0.86±0.06a	0.77±0.08b	0.016	0.042	0.763
	Yes	0.81±0.12a	0.78±0.09b*	0.72±0.13b			
GR (nmol NADPH/min/mg protein)	No	58.4±6.8a	70.4±11.6b	69.3±9.5a	<0.001	<0.001	0.986
	Yes	40.1±4.6a***	52.1±10.5b**	51.9±11.4b***			
Catalase (Units/mg protein)	No	348±128	396±106	389±119	0.905	0.809	0.797
	Yes	375±160	366±153	365±166			
SOD (Units/mg protein)	No	0.14±0.03a	0.14±0.03a	0.17±0.03b	0.059	<0.001	0.320
	Yes	0.10±0.05a	0.06±0.03b***	0.09±0.05ab***			
Catalase expression (AU)	No	81.7±6.2a	31.8±5.4b	99.8±6.2c	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	50.9±6.8a***	33.0±8.8b	33.3±5.7b***			
Mn-SOD expression (AU)	No	16.2±1.3a	14.0±1.2a	24.9±2.6b	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	40.5±2.5a***	116.2±3.6b***	31.8±4.0c***			
Cu,Zn-SOD expression (AU)	No	88.5±13.1	90.0±18.1	92.9±20.8	<0.001	0.003	0.002
	Yes	43.1±18.7a***	95.7±24.0b	108.0±29.8b			
GPx expression (AU)	No	29.2±6.3a	55.3±3.4b	33.2±5.9a	0.001	<0.001	<0.001
	Yes	38.2±8.1a*	18.0±6.1b***	20.2±7.8b***			
GR expression (AU)	No	76.5±12.7a	136.3±8.4b	83.2±7.8a	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	24.3±9.4a***	87.1±12.2b***	59.0±10.0c***			

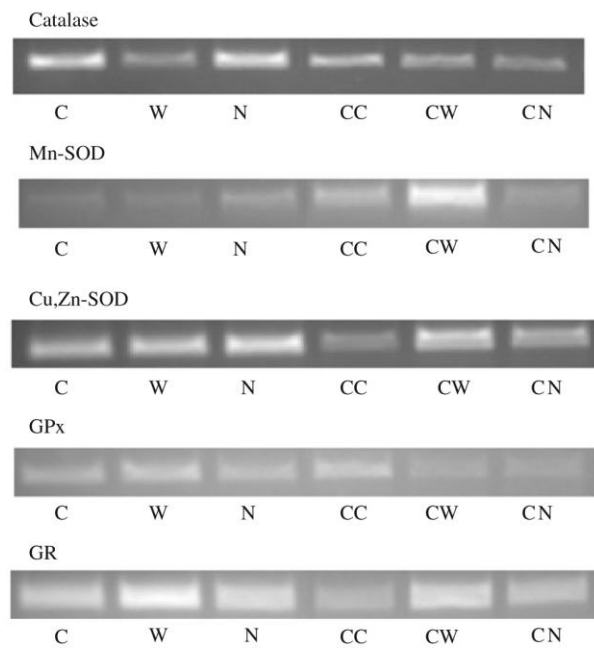
<sup>a</sup> Values (mean ± SD, *n*=10) in the same row bearing different letters were significantly different (*P*<0.05). Values for the same diet but with different cholesterol content bearing asterisks were significantly different (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001)

<sup>b</sup> GSSG/Total glutathione. For diet details see text and footnote of Table 2

for 10-weeks reduces body weight and body fat. The final body weight of rats in the present study was higher than that of a previous study [8], although the average food intake of the present study was 10% lower. The inclusion of meat, together with the higher fat and energy content of the present experimental diets, at least partially explain the differences in food intake between both studies. According to Bocanegra et al. [8] and Murata et al. [24], body weight gain was negatively affected by supplementary dietary cholesterol. Animals in the CC, CW, and CN groups consumed more than their respective basal counterparts, partially because of the lower energy content of the cholesterol-enriched diets. Present results indicate that CC and CW rats had a tendency to gain less weight than C and W rats. This effect was not seen in CN rats respect to N counterparts, probably due to the higher food intake of CN rats. The lower feed efficiencies may explain the lower body weight gains despite a higher feed and energy intake on the cholesterol fed rats. Further, these lower feed efficiencies may suggest that the digestibility of the diet

may be lower on the cholesterol fed diets, as the growth is determined by the amount of digestible energy.

The fact that W and N diets did not modify plasma cholesterol values was observed in studies using diets containing algae but not cholesterol [4, 8]. Concurring with other studies [4, 24, 25], cholesterol supplementation induced hypercholesterolemia in CC rats. Plasma cholesterol levels decreased in rats fed a cholesterol-enriched diet containing algal polysaccharides [26, 27]. While the CN diet partially inhibited dietary induction of hypercholesterolemia, the CW diet did not have the same effect. Ren et al. [28] described that some seaweed polysaccharides exert hypolipemic effects in rats fed a diet rich in sodium and cholesterol. Added to a casein-cholesterol diet, Nori induced lower plasma cholesterol levels in rats than Konbu [4]. Sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan were found to interact with dietary cholesterol to facilitate its excretion, while dietary agar was almost inactive [26]. Cholesterol-enriched diets produced hepatomegaly and steatosis and increased the hepato-somatic index [8, 29].



**Fig. 2** Effect of a cholesterol-enriched diet containing restructured meat with Wakame or Nori on catalase, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GPx, and GR mRNA expression, assayed by RT-PCR analysis, in liver homogenates of Wistar rats

Inclusion of Wakame or Nori did not decrease the hepatomegaly induced by cholesterol feeding. However, Bocanegra et al. [8] found that liver weight increased in rats fed diets enriched in cholesterol and algae. Wong et al. [22] did not find any significant differences in the liver weights of rats given various diets containing algae and cholesterol.

To the best of our knowledge this is the first study of the effect of seaweed-RM consumption on antioxidant enzyme gene expression and activities. Pork meat contains high levels of Fe and Cu [30]. Iron charge produces liver peroxidation and oxidative damage. Fe has been associated with oxidative stress but no evidence of the ability of the intestinal tract and/or the liver to decrease this oxidative stress exists. Furthermore, the inclusion of algae, rich in antioxidants, would counterbalance the pro-oxidant effect of Fe and/or Cu [3]. Study results suggest that the N diet affected the antioxidant status through a complex mechanism which involved total GPx, GR, and SOD activities. On the other hand, the W diet increased only GR values, suggesting that the increased glutathione recycling observed mainly as a result of this diet was responsible for the drop in the redox index. Only W-meat significantly decreased catalase mRNA levels. Catalase activity tended to increase in the liver of rats consuming W- meats or N-meats. Catalase protects the cells from hydrogen peroxide and plays an important role in adaptation to oxidant stress. Results of the W-diet are in accordance with those of Murata et al. [24] who found that a diet containing Wakame had no significant effect on catalase activity in rats.

The mechanisms by which N-diets and W-diets influence catalase, Mn-SOD, and GSH expression and activities in different ways have not yet been identified but must related to differences in their polyphenol, fiber, mineral, and fatty acid contents [3]. Brown seaweeds display high phlorotannin concentrations [31], and polymeric phlorotannins inhibit enzymes implicated in radical species production [32, 33]. According to Nikaido et al. [34], as blocks the production of GSH and total glutathione. Bocanegra et al. [8] suggested

**Table 4** Effect of cholesterol and non cholesterol-enriched diets containing restructured meat with Wakame or Nori on glutathione status and TBARS concentrations in liver homogenates of Wistar rats<sup>a</sup>

	Added cholesterol	Control meat diets (C, CC)	Wakame-meat diets (W, CW)	Nori-meat diets (N, CN)	ANOVA		
					Diet effect	Cholesterol effect	Diet × Cholesterol interaction
Total glutathione (μg/mg protein)	No	9.48±0.78a	11.08±1.54b	9.80±1.34a	0.003	0.920	0.485
	Yes	8.74±1.92a	11.34±2.17b	10.42±2.20ab			
GSH (μg/mg protein)	No	6.97±0.78a	8.89±1.27b	7.62±0.98ab	<0.001	<0.001	0.984
	Yes	3.62±0.87a***	5.46±0.96b***	4.30±0.90a***			
GSSG (μg/mg protein)	No	2.51±0.58	2.20±0.32	2.18±0.60	0.650	<0.001	0.170
	Yes	5.12±1.30***	5.88±1.51***	6.12±1.55***			
Redox index <sup>b</sup>	No	0.27±0.06a	0.20±0.01b	0.22±0.04ab	0.001	<0.001	0.311
	Yes	0.58±0.06a***	0.52±0.05b***	0.59±0.06a***			
TBARS (μmol/mg protein)	No	9.34±2.63	10.4±2.63	9.72±3.75	0.551	<0.001	0.135
	Yes	62.3±11.1***	69.6±12.4 ***	68.5±8.1***			

<sup>a</sup> Values (mean ± SD, n=10) in the same row bearing different letters were significantly different ( $P<0.05$ ). Values for the same diet but with different cholesterol content bearing asterisks were significantly different (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ )

<sup>b</sup> GSSG/Total glutathione. For diet details see text and footnote of Table 2



negative effect of As on glutathione status after algae consumption. The As content of the restructured meat consumed in the present study was lower than that used by Bocanegra et al. [8] (data not shown) explaining, at least in part, the absence in the present study of a significant negative effect of W-meat and N-meat on GSH. W-meat actually increased total glutathione and GSH concentrations and decreased the redox index. Moreover, the increase observed in GR values could counterbalance the negative effect of As on GSH.

Present results on enzyme activities and expression seem contradictory; however, several studies suggest that these two parameters do not always follow a parallel course [19]. This lack of correlation may be due to the alteration of post-transcription events such as translation and transport of gene products. It could result in loss of functional molecules, minor post-transductional changes, and finally, no changes in GPx and GR activities. On the other hand, the cellular redox state and the GSSG/total glutathione ratio are involved in the activation of transcriptional factors such as API o NF- $\kappa$ B that participate in antioxidant enzyme expression.

Diets enriched in cholesterol induced oxidative stress, measured as TBARS, coinciding with the findings of Lin et al. [35]. Nonetheless, W-meat diet increased GSH levels and decreased the redox index in the presence of added dietary cholesterol. Cholesterol feeding decreased most enzyme activities in the CC, CW, and CN groups. However, supplementary cholesterol had different effects on CW and CN rats. While CW rats displayed 30% higher GR and 40% lower SOD levels than CC animals, rats in the CN group presented 30% higher GR values than their CC counterparts. These results contrast with those of Bocanegra et al. [8] who found that cholesterol feeding significantly increased Se dependent- and total GPx activities and GR levels (about 1.5-fold). As previously commented, meat contains high amounts of Fe, known to increase free radical stress [9]. In fact, present GSSG levels in C animals were much higher than those described by Bocanegra et al. [8]. Although W-meat was not able to completely block the decrease of GSH induced by dietary cholesterol, CW animals displayed higher expression of GR, Cu,Zn-SOD, and Mn-SOD, and lower expression of GPx, than their CC counterparts, suggesting that the CW diet affected antioxidant status positively by maintaining high GSH levels. GSH values and the redox index of CN rats indicate that their diet did not improve their antioxidant status, although increases in the expression of some antioxidant enzymes were observed. Ringseis and Eder [36] concluded that oxidized dietary cholesterol gives rise to significantly higher mRNA concentrations of GPx and SOD and GPx activity, but lower concentrations of total glutathione and GSH in the liver than rats fed diets containing non-oxidized cholesterol. Present study data concur with those findings.

In conclusion, a diet containing meat enriched in Wakame and Nori was well accepted by growing Wistar rats and induced adequate body weight gain. According to the present data, W-meat offers antioxidant properties while N-meat displays hypocholesterolemic effects. More studies are needed for a better comprehension of the differences observed in hypocholesterolemic and antioxidant effects of Nori-RM vs. Wakame-RM in order to permit extrapolation of present results to human.

**Acknowledgements** The present study was supported by the Spanish projects AGL2005-07204-C02-01/ALI, AGL-2008 04892-C03-02, and Consolider-Ingenio 2010 # CSD2007-00016. We acknowledge the predoctoral fellowship of Universidad Complutense, Madrid, Spain to Adriana Schultz, that of Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) from Bolivarian Republic of Venezuela to Raul Olivero-David and the foreign Postgrado fellowship granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres.

## References

1. Jimenez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S (2001) Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci* 59:5–13
2. Lopez-Lopez I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sanchez-Muniz FJ, Cofrades S, Jimenez-Colmenero F (2009) Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* 83:492–498
3. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Rodenas S, Sanchez-Muniz FJ (2009) Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food* 12:1–24
4. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Nus M, Sanchez-Montero JM, Sanchez-Muniz FJ (2009) Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br J Nutr* 102:1728–1739
5. Mahfouz MM, Kummerow FA (2000) Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 11:293–302
6. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W (1999) Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: fate of early lesions in children (FELIC) study. *Lancet* 354(9186):1234–1241
7. Iwai K (2008) Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga (*Ecklonia stolonifera*) in genetically diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Plant Foods Hum Nutr* 63:163–169
8. Bocanegra A, Benedi J, Sanchez-Muniz FJ (2006) Differential effects of Konbu and Nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 95:696–702
9. Wright MO, Burden V, Lee J, Eitenmiller RR, Fischer JG (1999) High dietary iron enhances oxidative stress in liver but does not increase aberrant crypt foci development in rats with low vitamin E status. *Nutr Cancer* 35:143–152
10. Barga de Quiroga G, Perez de Campo R, Lopez-Torres M (1990) Antioxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem J* 272:247–250
11. Paglia D, Valentine W (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169

12. Lawrence R, Burk R (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium- deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 7:952–958
13. Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121–126
14. Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 243–247
15. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
16. Hissin PF, Hilf R (1976) A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
17. Mihara M, Uchiyama M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271–278
18. Chomeczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
19. Olivero-David R, Bastida S, Schultz A, Gonzalez-Torres L, Gonzalez-Munoz MJ, Sanchez-Muniz FJ, Benedi J (2010) Fasting status and thermally oxidized sunflower oil ingestion affect the intestinal antioxidant enzyme activity and gene expression of male Wistar rats. *J Agric Food Chem* 58:2498–2504
20. Colombo ML, Risè P, Giavarini F, de Angelis L, Galli C, Bolis CL (2006) Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Plant Foods Hum Nutr* 61:67–72
21. Yan X, Nagata T, Fan X (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods Hum Nutr* 52:253–262
22. Wong KH, Sam SW, Cheung PCK, Ang PO (1999) Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr Res* 19:1519–1527
23. Oben J, Enonchong E, Kuete D, Mbanya D, Thomas TC, Hildreth DJ, Ingolia TD, Tempesta MS (2007) The effects of ProAlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids Health Dis* 6:20
24. Murata M, Sano Y, Ishihara K, Uchida M (2002) Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J Nutr* 132:742–747
25. Viejo J, Garcia-Linares MC, Bastida S, Garcia-Arias MT, Sanchez-Muniz FJ (2003) Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int* 9: 329–338
26. Jimenez-Escrig A, Sanchez-Muniz FJ (2000) Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 20:585–598
27. Ito K, Tsuchiya Y (1972) The effect of algal polysaccharides on the depressing of plasma cholesterol level in rats. In: *Proceeding of the Seventh International Seaweed Symposium*. Tokyo/University Press, pp 451–454
28. Ren D, Noda H, Amano H, Nishino T, Nishizawa K (1994) Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish Sci* 60:83–88
29. Sanchez-Muniz FJ, Cava F, Viejo JM, Bastida S, Higon E, Marcos A (1996) Olive oil-fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell-damage marker enzymes. *Nutr Res* 16:111–121
30. Jimenez-Colmenero F (2007) Meat based functional foods. In: Hui YH, Chandan R, Clark S, Cross NA, Nollet LM (eds) *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hui John Wiley & Son, New Jersey, pp 989–1015
31. Glombitza KW, Keusgen M (1995) Fuhalsols and deshydroxyfuhalsols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry* 38:987–995
32. Shibata T, Nagayama K, Tanaka R, Yamaguchi K, Nakamura TJ (2003) Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *J Appl Phycol* 15:61–66
33. Kang HS, Kim HR, Byun DS, Son BW, Nam TJ, Choi JS (2004) Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch Pharm Res* 27:1226–1232
34. Nikaido M, Pi J, Jumagai Y, Yamauchi H, Taguchi K, Horiguchi S, Sun Y, Sun G, Shimojo N (2003) Decreased enzyme activity of hepatic thioredoxin reductase and glutathione reductase in rabbits by prolonged exposure to inorganic arsenate. *Environ Toxicol* 18:306–311
35. Lin CC, Yin MC, Hsu CC, Lin MP (2004) Effect of five cysteine containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/cAmice consuming a high saturated fat diet. *Lipids* 39:843–848
36. Ringseis R, Eder K (2004) Dietary oxidized cholesterol increases expression and activity of antioxidative enzymes and reduces the concentration of glutathione in the liver of rats. *Int J Vitam Nutr Res* 74:86–92

#### 5.4. PUBLICACIÓN N° 4.

**Food Chemistry** 129 (2011) 1623–1630. **ISI Web. JCR. (2011).** Índice impacto: 3.655 (6 de 128 en Food Science & Technology)

**Efectos de dietas enriquecidas con reestructurados cárnicos, conteniendo *Himanthalia elongata*, sobre la inducción de hipercolesterolemia, expresión génica de la CYP7A1, actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes en ratas en crecimiento**

Adriana R. Schultz Moreira; Juana Benedí; Laura González-Torres; Raul Olivero-David; Sara Bastida; Maria Isabel Sánchez-Reus; María José González-Muñoz; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Los consumos de carne y carne de cerdo son muy elevados en España. Las algas marinas son ricas en fibra, minerales y sustancias bioactivas. Debido a la creciente demanda de carnes saludables, en este trabajo se estudió el efecto de las dietas que contienen reestructurados de carne de cerdo (RC) enriquecido con *Himanthalia elongata* sobre: (1) la colesterolemia; (2) la expresión génica del citocromo hepático P450 7A1 (CYP7A1); (3) las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas y la expresión génica de las mismas; (4) las concentraciones del sustrato de antioxidantes hepáticos. Cuatro grupos de 10 ratas Wistar fueron alimentadas durante 35 días con una mezcla de 85% AIN-93 M + 15% RC liofilizado. El grupo control (C) consumió RC control, el grupo Espagueti de Mar (SS), RC con Espagueti de Mar al 5%. Los animales que ingirieron suplementos de colesterol (ColC y ColSS) consumieron las dietas basales C y SS enriquecidas con colesterol y ácido cólico como agente hipercolesterolemia. La ingesta de alimentos se vio afectada significativamente por la interacción alga x colesterol y por el colesterol dietético (ambos  $p < 0,001$ ). El colesterol plasmático afectó significativamente por la interacción colesterol x alga ( $p < 0,05$ ). Las ratas ColC incrementaron significativamente el colesterol en el plasma ( $p < 0,001$ ) respecto a las C, mientras que el colesterol en plasma de ColSS fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el de las ratas ColC. Las concentraciones del glutatión oxidado (GSSG) y todas las expresiones génicas se afectaron significativamente por la interacción colesterol x alga (al menos  $p < 0,05$ ). El grupo SS vs. C mostró diferencias significativas en la expresión génica (al menos  $p < 0,05$ ) como el incremento de la superóxido dismutasa (Mn-SOD y Cu, Zn-SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), y la disminución de la glutatión reductasa (GR); y el aumento de la actividad enzimática de GR, GSSG y el índice redox. Las ratas ColSS vs. ColC difirieron significativamente en la expresión génica (al menos  $p < 0,05$ ) con incrementos de CYP7A1, GR y Cu,Zn-SOD, pero con disminución de catalasa, Mn-SOD y GPx, e incremento de la actividad enzimática de GR. En conclusión, el alga Espagueti de Mar podría ser ampliamente utilizada en el diseño de RC. Su adicción a los RC sin el suplemento del colesterol reduce los mecanismos de oxidación. La dieta SS-RC bloquea parcialmente el efecto del agente hipercolesterolemia, dando lugar a un nuevo equilibrio de la expresión génica de las enzimas antioxidantes.



Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats

Adriana R. Schultz Moreira<sup>a</sup>, Juana Benedí<sup>b</sup>, Laura González-Torres<sup>a</sup>, Raul Olivero-David<sup>a,c</sup>, Sara Bastida<sup>a</sup>, Maria Isabel Sánchez-Reus<sup>d</sup>, María José González-Muñoz<sup>c</sup>, Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, E-28871 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 February 2011

Received in revised form 19 May 2011

Accepted 14 June 2011

Available online 21 June 2011

## Keywords:

Spaghetti seaweed

Cholesterol

Antioxidants

Enzyme expression

## ABSTRACT

Meat and pork consumptions are very high in Spain. Seaweeds are rich in fibre, minerals, and bioactive substances. Due to the growing demand for healthier meats, this work studied the effect of diets containing restructured pork (RP) enriched with *Himanthalia elongata* (Sea Spaghetti) on: (1) cholesterolaemia; (2) liver cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) expression; (3) liver antioxidant enzyme activities and gene expression; (4) the liver antioxidant substrate concentrations. Four groups of 10 Wistar rats each were fed a mix of 85% AIN-93 M rodent diet and 15% freeze-dried RM for 35 days. The control group (C) consumed control RP; the Sea Spaghetti (SS) group, RP with 5% Sea Spaghetti. Animals on added cholesterol diets (CholC and CholSS) consumed their basal C and SS diets enriched with cholesterol and cholic acid as hypercholesterolaemic agent. Food intake was significantly affected by the alga  $\times$  cholesterol interaction and by dietary cholesterol (both  $p < 0.001$ ). Plasma cholesterol was significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction ( $p < 0.05$ ). CholC rats showed significantly higher plasma cholesterol ( $p < 0.001$ ) than did their C counterparts, whilst serum cholesterol of CholSS was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that of CholC. The glutathione peroxide (GSSG) concentrations and all mRNA expressions were significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction (at least  $p < 0.05$ ). SS vs C group showed significant (at least  $p < 0.05$ ) increases in superoxide dismutase (Mn-SOD and Cu,Zn-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and decrease of glutathione reductase (GR) expressions, and increased GR activity, GSSG and the redox index. CholSS vs CholC showed significant (at least  $p < 0.05$ ) increases of CYP7A1, GR and Cu,Zn-SOD expression but decreases in catalase, Mn-SOD and GPx expression, and increase of GR activity. In conclusion, Sea Spaghetti could be widely used in RP design. Its addition to non-cholesterol enriched RP diet reduced oxidation mechanisms. SS-RP partially blocked the effect of the hypercholesterolaemic agent, giving rise to a new balance of the antioxidant enzyme expression.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** C, control-restructured pork diet; CAT, catalase; CHD, coronary heart disease; CholC, control restructured pork diet enriched in cholesterol; CholSS, Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol; CYP7A1, cytochrome P450 7A1; dNTP, deoxynucleotide mix; DTT, dithiothreitol; GSH, reduced glutathione; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSSG, oxidised glutathione; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; RP, restructured pork; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SS, Sea Spaghetti-restructured pork diet; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Plaza Ramón y Cajal s/n, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941828; fax: +34 91 3941810.

E-mail address: [frasan@farm.ucm.es](mailto:frasan@farm.ucm.es) (F.J. Sánchez-Muniz).

0308-8146/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.019

## 1. Introduction

Meat and meat products are basic dietary components, concentrating and supplying a large number of nutrients (essential amino acids, vitamins and minerals) (Hamm, 1991) but their consumption has been epidemiologically linked to major degenerative diseases, such as coronary heart disease (CHD) (Navas-Carretero et al., 2009). Meat and pork consumptions are rather high in Spain (MAPA, 2010). Due to the growing demand for healthier meats, several restructured meats or meat derivatives have been designed. In fact, low-fat and low-salt restructured meat, with various added bioactive compounds, offer an interesting alternative to conventional meat products (Jiménez-Colmenero, 2007; Jiménez-Colmenero, Reig, & Toldrá, 2006; Jiménez-Colmenero, Sánchez-Muniz,



Olmedilla-Alonso, & collaborators., 2010) as they display health benefits with respect to control meats (Canales et al., 2007, 2011).

Seaweeds and/or their water-soluble fraction or isolated algal polysaccharides may present antioxidant (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, & Sanchez-Muniz, 2009; Cornish & Garbary, 2010; Jiménez-Escrig & Goñi, 1999) and hypolipemiant properties (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009; Jiménez-Escrig & Sánchez-Muniz, 2000; Koseki, Tsuji, Kazama, Kitabatake, & Doi, 1990). However, the composition of seaweeds varies, which in turn conditions their health properties (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009; O'Sullivan et al., 2010; Cornish & Garbary, 2010). Our research group studied the differential effects of some seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normal and hypercholesterolaemic growing rats. Nori vs Wakame consumption led to differences in total and reduced glutathione, glutathione reductase (GR) activity, plasma cholesterol, and total antioxidant capacity (Bocanegra, Benedi, & Sánchez-Muniz, 2006). More recently, our group has found that the inclusion of Wakame in restructured pork (RP), included in cholesterol-enriched diets, affected the antioxidant enzyme gene expressions and activities, whilst including Nori affected the plasma cholesterol in growing Wistar rats (Moreira et al., 2010). Cholesterol-enriched diets have different effects on lipid peroxidation, with hypercholesterolaemic animals presenting higher peroxidation values than normocholesterolaemics (Bocanegra et al., 2006; Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009; Bocanegra, Bastida, Benedi, Nus, et al., 2009; Mahfouz & Kummerow, 2000).

Cholesterol is mainly eliminated from the body via bile acid production. Cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase, also known as cholesterol 7- $\alpha$ -monooxygenase or cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), is an enzyme that, in humans, is encoded by the CYP7A1 gene (Cohen et al., 1992). It is upregulated by the nuclear receptor LXR (liver X receptor) when cholesterol (specifically oxysterol) levels are high (Pandak et al., 2001). Cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase is the rate-limiting enzyme in the synthesis of bile acid from cholesterol via the classic pathway, catalysing the formation of 7- $\alpha$ -hydroxycholesterol (Cadenas & Davies, 2000).

*Himanthalia elongata* is a very common seaweed of the Galician coast (N.W. Spain), where the oceanographic phenomenon of upwelling occurs, with the growth of dense seaweed fields (Ferreiro García, Acuña Castroviejo, & Duran Neira, 1993). This alga is highly valued in Europe for its excellent nutritional and gastronomic qualities and has been included in different foods. It is known as "Sea Spaghetti" or "haricot" (Punín Crespo & Lage Yusty, 2004). Although ample information is available on the antioxidant and hypolipemiant properties of Nori, Konbu and other seaweeds, the authors are only aware of a few studies testing, *in vitro*, the antioxidant properties of Sea Spaghetti and are not aware of any involving consumption of Sea Spaghetti enriched-RP. No studies appear to be available on the effect of RP on antioxidant enzyme gene expression. The present paper hypothesises that the consumption of diets including RP enriched with *H. elongata* positively modifies the cholesterolaemia and the antioxidant status of growing rats. Due to the growing demand for healthier meats, this study aimed to investigate, in growing Wistar rats, the effects of 5-week consumption of cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched diets on: (1) cholesterolaemia; (2) liver CYP7A1 expression; (3) liver antioxidant enzyme activities and gene expression. This work also studied the effect on liver antioxidant substrate concentrations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and treatments

Forty male growing Wistar rats, with an average body weight of 90 g at the outset, were obtained from Harlan Laboratories Models,

SL, Barcelona (Spain) and handled according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Research Council. The animals were housed individually in metabolic cages in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.8$  °C) with a 12 h light–dark cycle. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2005-07204-C02-01/ALI) and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). Rats were fed powdered commercial chow rat diet (Panlab, Barcelona, Spain) during a 1-week period of adaptation to environmental conditions and then distributed, according to body weight, into four homogeneous groups, of ten animals each, with an average body weight of approximately 123 g. All RP were prepared from pork. RP containing alga included 5% (w/w) of Sea Spaghetti. Four experimental powdered semi-synthetic diets (Table 1) were prepared: (a) the control (C) diet contained 85% rodent feed (AIN-93M, purified rodent diet; Dyets #180729, DYETS, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 15% freeze-dried control RP to which 4% wet matter microcrystalline cellulose had been added; (b) the Sea Spaghetti (SS) diet consisted of a mixture of AIN-93M #180729 feed (85%) and freeze-dried Sea Spaghetti RP (15%); (c) the control RP enriched in cholesterol (CholC) diet was identical to the C diet but with 2.43 % cholesterol and 0.49%

**Table 1**

Composition (g/kg) of the control restructured pork diet (C), the control restructured pork enriched in cholesterol diet (CholC), the Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS), and the Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol diet (CholSS).<sup>a</sup>

	C	SS	CholC	CholSS
<i>Diet AIN-93M</i>				
Maize starch (g/kg diet)	382.75	382.75	353.59	353.59
Cholesterol (g/kg diet)			24.31	24.31
Cholic acid (g/kg diet)			4.85	4.85
<i>Pork (freeze-dried)<sup>b</sup> (g/kg diet)</i>				
Control restructured pork <sup>b</sup> (g/kg diet)	150		150	
Sea Spaghetti-pork <sup>b</sup> (g/kg diet)		150		150
SFA (% total fatty acids in pork)	36.72	37.61	36.72	37.61
MUFA (% total fatty acids) <sup>c</sup>	52.62	50.02	52.62	50.02
PUFA (% total fatty acids) <sup>c</sup>	10.66	12.37	10.66	12.37
Polyphenols (as gallic acid equivalent) <sup>c</sup>	Trace	2570	Trace	2570
Iron (mg/100 g wet matter) <sup>c</sup>	0.855	0.698	0.855	0.698
Sodium (mg/100 g wet matter) <sup>c</sup>	873.8	565.9	873.8	565.9
Soluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>		1.35		1.35
Insoluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>	2.81	1.46	2.81	1.46

AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate.H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulphate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate-4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulphate-12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1 %), 2.50; vitamin A palmitate, (150000 µg/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10000 µg/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

<sup>a</sup> Other ingredients (g/kg diet): casein, 127.5; soyabean oil, 34; dyetose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 131.75; sucrose, 85; microcrystalline cellulose, 42.50; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.53; t-butylhydroquinone, 0.0068.

<sup>b</sup> Protein (g), fat (g), minerals (ash) and fibre (g) present in the 150 g of Control-pork, Sea Spaghetti freeze-dried restructured-pork; Control pork: 75.22, 48.99, 15.79 and 10 (microcrystalline cellulose), respectively; Sea Spaghetti-pork 69.56, 51.25, 15.05 and 14.12.

<sup>c</sup> Data in restructured pork (source López-López et al., 2009; Cofrades, López-López, Solas, Bravo, & Jiménez-Colmenero, 2008).

cholic acid substituting an equal amount of starch (AIN-93M # 180730 diet); (d) the Sea Spaghetti RP enriched in cholesterol (CholSS) diet was the SS diet enriched with 2.43% cholesterol and 0.49% cholic acid (Table 1). All experimental diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 5.4% total dietary fibre. Water and food were provided *ad libitum* over the 5-week experimental period.

Food intake was checked daily and body-weight variations were measured on alternate days. At the end of the experiment, in order to avoid inter-assay variations that could affect the comparison of data from the different groups, animals, under fasting conditions, were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and euthanised by extracting blood from the descending aorta with a syringe, taking an animal at a time, of each one of six groups. Liver was dissected and its major lobe snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Liver tissue (0.5 g) was cut into small pieces, homogenised in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), and centrifuged at 6500 rpm (3800g) at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 min. All spectrophotometric measurements were carried out in an Uvikon 930 UV spectrophotometer (Kontron Instruments, Munich, Germany).

## 2.2. Liver cholesterol

Lipids from homogeneous samples of hepatic tissue from the major lobe of the liver were obtained according to Folch, Lees, and Stanley (1957). Lipid extracts were dissolved in isopropanol and tested for total cholesterol, using the enzymatic colorimetric method (Kit reference # 1001090) of SPINREACT (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain). Turbidity in samples, when present, was eliminated by centrifuging at 2200g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min after the enzymatic–colorimetric reaction and before spectrophotometric reading, as indicated by Viejo (1992) and Viejo et al. (2003).

## 2.3. Plasma cholesterol

The cholesterol in plasma was determined by the enzymatic colorimetric method (kit reference # 1001090) of SPINREACT (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).

## 2.4. Enzyme assays

Liver glutathione reductase (GR) activity was evaluated according to the Barga de Quiroga, Perez de Campo, and Lopez-Torres (1990) method. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined as Se-dependent GPx and total GPx activities. Se-dependent GPx activity was assessed following the Paglia and Valentine (1967) method, and total GPx activity by the Lawrence and Burk (1976) method. Catalase (CAT) activity was determined according to Aebi (1984). Total superoxide dismutase (SOD) activity was determined as indicated by Marklund (1985) and Bhandari, Jain, and Pillai (2007). Enzyme activities were standardised to liver protein concentrations that were determined according to the Bradford (1976) method.

## 2.5. Glutathione status

Reduced glutathione (GSH) content was determined using a slight modification of the Hissin and Hill (1976) method, in which GSH was sequentially oxidised by o-phthalaldehyde and reduced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in the presence of GR. The oxidised glutathione (GSSG) level was determined by masking GSH with N-ethylmaleimide. The redox index was calculated as the GSSG/total glutathione ratio.

## 2.6. Lipid peroxide assay

Liver thiobarbituric acid-reactive substances' (TBARS') concentrations were determined in Tris–HCl (pH 7.4) homogenates according to Mihara and Uchiyama (1978).

## 2.7. Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Major lobe liver tissue (100–150 mg) was homogenised and total RNA was isolated, following the guanidinium thiocyanate/phenol reagent method (Chomczynski & Sacchi, 1987). Reverse transcription and amplification, using the Titan system, involved the preparation of two master-mixes on ice. Master mix 1 was comprised of deoxynucleotide mix (dNTP), primers, dithiothreitol (DTT), and sterile pre-chilled deionised water. Master mix 2 consisted of RT-PCR buffer (MgCl<sub>2</sub> and DMSO), enzyme mix (AMV reverse transcriptase, Taq DNA polymerase), and sterile pre-chilled deionised water. Twenty-four microliter of master mix 1, 25  $\mu\text{l}$  of master mix 2, and 1  $\mu\text{g}$  of extracted liver RNA were added to 0.2 ml PCR tubes kept on ice. This final mixture was vortexed and centrifuged briefly to collect the sample at the bottom of the tube, and RT was carried out at  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 min.  $\beta$ -actin cDNA was used as an internal control.

The sequences of the primers were as follows:

---

CAT sense: 5' GTGAGAACATTGCCAACAC 3';  
 CAT antisense: 5' CTCGGGAAATGTCATCAAAAAG 3';  
 Mn-SOD sense: 5' GACAAACCTGAGCCCTAAGGG 3';  
 Mn-SOD antisense: 5' CTTCTTGCAAACTATG 3';  
 Cu,Zn-SOD sense: 5' GCCGTGTGCGTGCTGAA 3';  
 Cu,Zn-SOD antisense: 5' TGACGATGCCGTGCTGCATG 3';  
 GPx sense: 5'CCAATCAGTTCGGACACCAG 3';  
 GPx antisense: 5'AAAGTTCACAGCAATGTCCT 3';  
 GR sense: 5'TCACTGCTCCGCACATCC 3';  
 GR antisense: 5'CTCAACACCGCCAGCGCTTCTCC 3';  
 CYP7A1 sense: 5'CACCATTCTGCAACCTT 3';  
 CYP7A1 antisense: 5'GTACCGGCAGGTCAATCA 3';  
 $\beta$ -Actin sense: 5' TACAACCTCCTTGACGTCC 3';  
 $\beta$ -Actin antisense: 5'GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC 3'.

---

The number of PCR cycles was adjusted to avoid saturation of the amplification system:  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 45 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s (30 cycles) for CAT;  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $52^{\circ}\text{C}$  for 1 min and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s (27 cycles) for Mn-SOD;  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 45 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s (30 cycles) for Cu,Zn-SOD;  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min (30 cycles) for GPx;  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $54^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 90 s (34 cycles) for GR;  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s (40 cycles) for CYP7A1;  $95^{\circ}\text{C}$  for 60 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 60 s (30 cycles) for CYP7A1;  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  for 45 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 s (24 cycles) for  $\beta$ -actin with a final elongation at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Amplification products were visualised on 1.8% agarose gels containing ethidium bromide (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): CAT product, 395 bp, Mn-SOD product, 361 bp; Cu,Zn-SOD product, 383 bp; GPx product, 260 bp; GR product, 296 bp; CYP7A1 product, 170 bp;  $\beta$ -actin product, 630 bp. A 100 bp DNA ladder was the marker used. The products were quantified by laser densitometry.

## 2.8. Statistical analyses

Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations. Differences in the growth rate induced by diets were assessed by ANCOVA test. Two-way ANOVA (cholesterol and alga factors),



followed by Student *t* test *post hoc* studies, were performed to analyse the effect of each factor. Results were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the SPSS version 15.0 statistical analysis packages (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Diet and restructured pork compositions

Table 1 shows some main differences between RP compounds and experimental diets. SS-RP and CholSS-RP contain more soluble fibre, polyphenols and iron than do C-RP and CholC-RP. Minor differences were found in saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid percentages and in the lysine/methionine ratio (data not shown). Diets have similar energy contents 3962.3–3964.6 kcal/kg for non-added cholesterol diets and 3845.6–3964.6 kcal/kg for added cholesterol diets (Table 1).

#### 3.2. Food intake and body weight gain

CholC and CholSS rats ate more ( $p < 0.001$ ) but had lower growing trends, calculated as the relationship between food consumption and body weight gain (slopes  $0.243 \pm 0.010$  and  $0.231 \pm 0.008$ , respectively) than had their C and SS counterparts ( $0.307 \pm 0.006$  and  $0.276 \pm 0.009$ , respectively) ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively). A significant cholesterol  $\times$  alga interaction was found for food intake ( $p < 0.001$ ), and body weight gain ( $p = 0.042$ ). Cholesterol in the diet significantly increased food intake ( $p < 0.001$ ); the SS group ate significantly less ( $p < 0.05$ ) than did the C group whilst the CholSS group ate more ( $p < 0.011$ ) than did the CholC group. The SS group showed lower body weight gain than the C group ( $p < 0.01$ ) but the cholesterol consumption did not significantly affect body weight gain (Table 2).

#### 3.3. Liver weight and hepatosomatic index

Liver weight was significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction ( $p = 0.023$ ) and by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ). Steatosis was observed in all livers from the CholC and CholSS groups. SS rats presented lower liver weight than did C rats ( $p < 0.05$ ). CholC and CholSS rats had higher liver weights than had their respective C and SS counterparts (both  $p < 0.001$ ) (Table 2). The hepatosomatic index was significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction ( $p = 0.045$ ) and by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ). The alga effect was borderline for statistical significance ( $p = 0.059$ ). The hepatosomatic indices of CholSS rats were higher than those of CholC ( $p < 0.05$ ) and SS ( $p < 0.001$ ) rats. CholC

rats presented higher hepatosomatic indices ( $p < 0.001$ ) than did their C counterparts (Table 2).

#### 3.4. Liver cholesterol

Table 2 shows that liver cholesterol ( $p = 0.019$ ) was significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction. Dietary cholesterol significantly affected liver cholesterol ( $p < 0.001$ ). SS livers show higher cholesterol content than do C livers ( $p = 0.014$ ). CholC and CholSS rats showed significantly higher liver cholesterol concentrations ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) than did their C and S counterparts. CholSS rats presented significantly higher liver cholesterol than did CholC rats ( $p < 0.05$ ).

#### 3.5. Plasma cholesterol level and CYP7 A1 expression

Table 2 shows the effect of alga and dietary cholesterol on cholesterolaemia. Plasma cholesterol was significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction ( $p < 0.001$ ), and the presence of alga ( $p < 0.001$ ) and cholesterol ( $p < 0.001$ ). CholC and CholSS rats showed significantly higher plasma cholesterol ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) than did their C and SS counterparts. CholSS rats showed significantly lower ( $p < 0.05$ ) serum cholesterol than did CholC rats. CYP7 A1 expressions were significantly affected by cholesterol ( $p < 0.001$ ) and alga feeding ( $p = 0.015$ ). CYP7A1 expression was significantly higher (both  $p < 0.001$ ) in CholC and CholSS than C and SS groups, respectively, and in SS and CholSS (both  $p < 0.05$ ) than in their respective C and CholC counterparts (Table 2).

#### 3.6. Liver enzymes

Liver enzymes were not significantly affected ( $p > 0.05$ ) by the cholesterol  $\times$  alga interaction. Total GPx and Se-GPx activities were significantly decreased by dietary cholesterol feeding ( $p = 0.015$  and  $p < 0.001$ , respectively); CholC and CholSS showed less Se-GPx activity than did their C and SS counterparts ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively). CholC rats presented lower total GPx than did the C group ( $p < 0.01$ ). GR activity was significantly affected by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ) and alga ( $p = 0.001$ ). CholSS rats presented lower GR activities ( $p < 0.05$ ) than did their SS counterparts. CAT and SOD activity and the Se-GPx/Total GPx ratio were not affected ( $p > 0.05$ ) by cholesterol and/or alga consumption (Table 3).

**Table 2**

Food intake, final body-weight, liver weight, hepatosomatic index, liver cholesterol and plasma cholesterol and CYP7A1 expression of Wistar rats fed the control restructured pork diet (C), the control restructured pork enriched in cholesterol diet (CholC), the Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS), and the Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol diet (CholSS).

	ANOVA						
	C	CholC	SS	CholSS	Alga effect	Cholesterol effect	Interaction
Food intake (g/d)	19.1 $\pm$ 1.3	21.2 $\pm$ 1.2***	17.8 $\pm$ 1.1a	22.8 $\pm$ 0.93b***	0.681	<0.001	<0.001
Body-weight gain (g)	192.0 $\pm$ 16.0	178.6 $\pm$ 26.3	163.7 $\pm$ 15.84b	177.9 $\pm$ 23.4	0.033	0.955	0.042
Liver weight (g)	8.9 $\pm$ 0.51	16.7 $\pm$ 2.9***	8.13 $\pm$ 0.93a	18.9 $\pm$ 2.5***	0.283	<0.001	0.023
Hepatosomatic Index*	2.9 $\pm$ 0.24	5.5 $\pm$ 0.65***	2.9 $\pm$ 0.29	6.2 $\pm$ 0.72a***	0.050	<0.001	0.045
Liver cholesterol ( $\mu$ mol/g)	10.6 $\pm$ 0.8	125 $\pm$ 8.8***	10.9 $\pm$ 0.8	140 $\pm$ 15.8a***	0.014	<0.001	0.019
Plasma cholesterol (mM)	1.5 $\pm$ 0.50	6.1 $\pm$ 1.5***	1.6 $\pm$ 0.17	3.1 $\pm$ 1.1a**	<0.001	<0.001	<0.001
CYP7A1 (expression vs C group, %)	100 $\pm$ 0	381 $\pm$ 143.9***	165 $\pm$ 80.9a	576 $\pm$ 177.4c***	0.015	<0.001	0.295

Values are the means  $\pm$  standard deviation of ten animals.

CholC and CholSS values for the same parameter bearing asterisks were significantly different (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively. CholSS and SS values for the same parameter bearing a letter were significantly different (a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.001$ ) from CholC and C values, respectively.

\* 100  $\times$  liver weight (g)/body weight (g).

### 3.7. Glutathione status

GSSG concentrations were affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction ( $p = 0.048$ ). GSSG, GSH, and the redox index were significantly affected by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ). GSSG decreased in the SS group with respect to the C group ( $p < 0.05$ ). CholC and CholSS rats presented higher GSSG and redox index but lower GSH levels than did C and SS rats, respectively (all,  $p < 0.001$ ) (Table 3).

### 3.8. TBARS

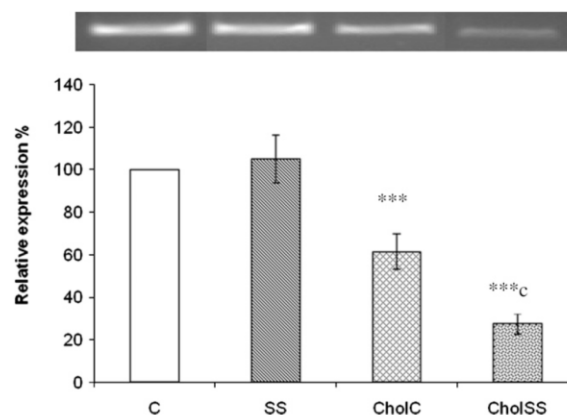
TBARS were significantly affected by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ) but not by alga consumption ( $p > 0.05$ ). TBARS were significantly increased in CholC and CholSS groups with respect to C and SS, respectively (both,  $p < 0.001$ ) (Table 3).

### 3.9. RT-PCR antioxidant enzyme analysis

Figs. 1–5 show the mRNA expressions of CAT; Mn-SOD; Cu,Zn-SOD; GPx, and GR, respectively. All mRNA expressions were significantly affected by the cholesterol  $\times$  alga interaction (at least  $p < 0.05$ ). CAT, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD and GPx expressions were significantly affected by cholesterol ( $p < 0.001$ ) and alga feeding (at least  $p \leq 0.05$ ). GR expression was not affected by dietary cholesterol. CAT expression in CholC and CholSS decreased with respect to C and SS groups ( $p < 0.001$ ) and CholSS vs CholC ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1). Mn-SOD expression was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in CholC vs C and SS vs the C groups and lower ( $p < 0.001$ ) in CholSS vs the SS and CholSS vs CholC groups. Mn-SOD expression increased as a result of cholesterol feeding ( $p < 0.001$ ) in the control group but decreased in the Sea Spaghetti group ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2). Cu,Zn-SOD expression was higher ( $p < 0.001$ ) in SS vs the C group and lower ( $p < 0.001$ ) in CholSS vs the SS and CholC vs C groups (Fig. 3). GPx expression was higher ( $p < 0.01$ ) in SS vs the C group and lower in CholSS vs the SS ( $p < 0.001$ ) and CholSS vs CholC groups ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4). GR expression was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in CholSS vs CholC and CholSS vs SS groups and lower ( $p < 0.001$ ) in CholC vs the C and SS vs C groups.

## 4. Discussion

The data obtained suggest, for the first time, that consumption of Sea Spaghetti-RP offers protection against cardiovascular disease



**Fig. 1.** Catalase expression in liver homogenates of rats. The panel shows a representative gene expression profile of catalase assayed by RT-PCR analysis (catalase product of 395 bp). Control restructured pork diet (C); Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS); Control restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholC); Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholSS). The results, expressed as % expression of the control, are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Cholesterol  $\times$  alga interaction:  $p < 0.001$ , cholesterol effect:  $p < 0.001$ , alga effect:  $p < 0.001$ . CholC and CholSS values bearing asterisks (\*\*\*) were significantly different from C and SS values, respectively. S and CholSS values bearing a letter were significantly different ( $p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively.

from two points of view: by decreasing cholesterol and by exerting antioxidant effects.

The SS diet was relatively well accepted, although it produced a lower growth rate than did the C diet. This effect could be related to the high soluble fibre content of the SS diet, as [Oben et al. \(2007\)](#) found that 1 fl oz/day of an oral infusion of ProAlgaZyme for 10-weeks reduced body weight and body fat, suggesting that algae could be useful components of hypocaloric diets. However, [Wong, Sam, Cheung, and Ang \(1999\)](#) reported that seaweed-fed rats and controls displayed similar food intake rates. [Murata, Sano, Ishihara, and Uchida \(2002\)](#) showed that Wakame seaweed and/or fish oil were consumed at similar rates.

Although diets were approximately isocaloric, rats from the CholC and CholSS groups consumed 11% and 29%, respectively, more food than did their respective basal counterparts. [Naim, Morley, Kare, and Ingle \(1977\)](#) pointed out that, although factors such

**Table 3**

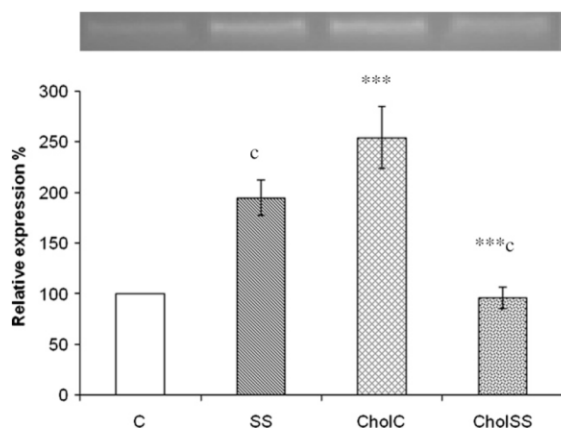
Liver glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities and liver total glutathione, reduced glutathione (GSH) and oxidised glutathione (GSSG) and TBARS concentrations of Wistar rats fed the control restructured pork diet (C), the control restructured pork enriched in cholesterol diet (CholC), the Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS), and the Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol diet (CholSS).

	ANOVA						
	C	CholC	SS	CholSS	Alga effect	Cholesterol effect	Interaction
Se-dependent GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	2151 $\pm$ 214	1666 $\pm$ 201***	2158 $\pm$ 387	1641 $\pm$ 473**	0.935	<0.001	0.889
Total GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	2547 $\pm$ 261	2079 $\pm$ 383**	2737 $\pm$ 488	2247 $\pm$ 890	0.344	0.015	0.954
Se-dependent GPx/Total GPx	0.85 $\pm$ 0.64	0.82 $\pm$ 0.12	0.80 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.26	0.425	0.682	0.872
GR (nmol NADPH/min/mg protein)	58.4 $\pm$ 6.8	40.1 $\pm$ 4.7***	70.1 $\pm$ 9.5b	47.6 $\pm$ 9.6a***	0.001	<0.001	0.420
CAT (Units/mg protein)	348 $\pm$ 128.1	375 $\pm$ 159.8	420 $\pm$ 149.3	362 $\pm$ 155.5	0.547	0.760	0.393
SOD (Units/mg protein)	0.15 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.05	0.483	0.342	0.416
Total glutathione ( $\mu$ g/mg protein)	9.5 $\pm$ 0.78	8.7 $\pm$ 1.9	9.5 $\pm$ 2.7	10.5 $\pm$ 2.5	0.199	0.857	0.226
GSSG ( $\mu$ g/mg protein)	2.5 $\pm$ 0.58	5.1 $\pm$ 1.3***	1.9 $\pm$ 0.54a	6.1 $\pm$ 1.8***	0.648	<0.001	0.048
GSH ( $\mu$ g/mg protein)	7.0 $\pm$ 0.78	3.6 $\pm$ 0.87***	7.64 $\pm$ 2.2	3.4 $\pm$ 0.98***	0.107	<0.001	0.895
Redox Index	0.26 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.06***	0.20 $\pm$ 0.03b	0.57 $\pm$ 0.07***	0.056	<0.001	0.145
TBARS ( $\mu$ mol/mg protein)	13.6 $\pm$ 12.2	62.3 $\pm$ 11.1***	14.8 $\pm$ 11.0	68.1 $\pm$ 11.2***	0.352	<0.001	0.533

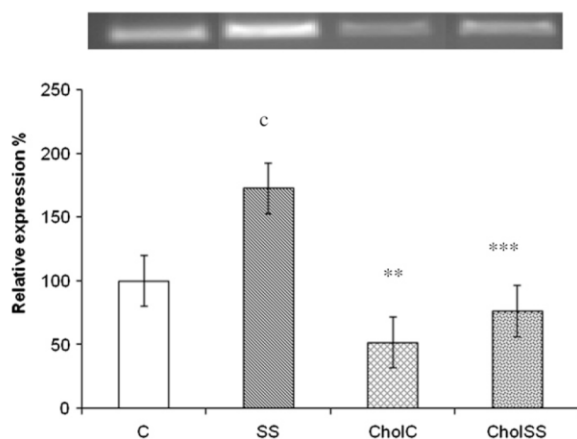
Values are the means  $\pm$  standard deviation of ten animals.

TBARS; Thiobarbituric acid reactive substances.

CholC and CholSS values for the same parameter bearing asterisks were significantly different (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively. CholSS and SS values for the same parameter bearing a letter were significantly different (a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.001$ ) from CholC and C values, respectively.



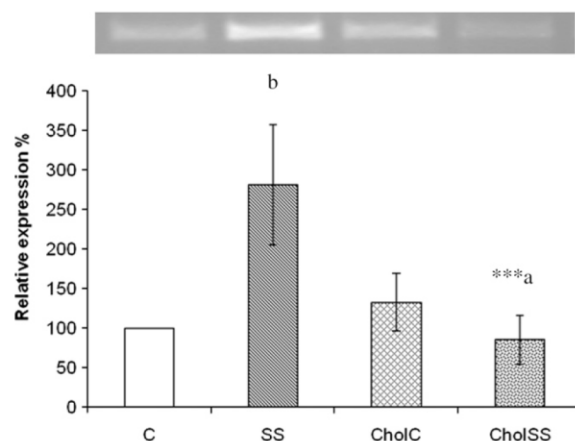
**Fig. 2.** Mn-SOD expression in liver homogenates of rats. The panel shows a representative gene expression profile of Mn-SOD assayed by RT-PCR analysis (Mn-SOD product of 361 bp). Control restructured pork diet (C); Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS); Control restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholC); Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholSS). The results, expressed as % expression of the control, are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Cholesterol  $\times$  alga interaction:  $p < 0.001$ , cholesterol effect:  $p < 0.001$ , alga effect:  $p < 0.001$ . CholC and CholSS values bearing asterisks (\*\*\*) were significantly different from C and SS values, respectively. S and CholSS values bearing a letter were significantly different ( $^c p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively.



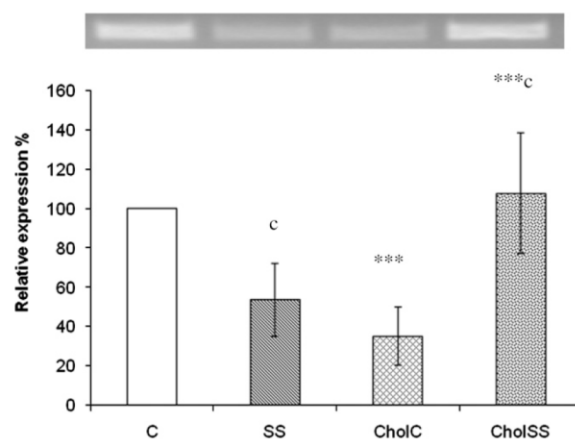
**Fig. 3.** Cu,Zn-SOD expression in liver homogenates of rats. The panel shows a representative gene expression profile of Cu,Zn-SOD assayed by RT-PCR analysis (Cu,Zn-SOD product of 383 bp). Control restructured pork diet (C); Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS); Control restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholC); Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholSS). The results, expressed as % expression of the control, are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Cholesterol  $\times$  alga interaction:  $p = 0.028$  cholesterol effect:  $p < 0.001$ , alga effect:  $p < 0.001$ . CholC and CholSS values bearing asterisks (\*\*\*) were significantly different from C and SS values, respectively. S and CholSS values bearing a letter were significantly different ( $^c p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively.

as taste, smell and texture, are decisive in the dietary intake, post-intake factors may also affect the acceptance of a diet.

CholC diets produced hepatomegaly and steatosis and increased the hepatosomatic index and the liver cholesterol content, as shown by others (Bocanegra et al., 2006; Fukushima et al., 2001; Sanchez-Muniz, Garcia Linares, Garcia Arias, Bastida, & Viejo, 2003; Sanchez-Muniz et al., 1996). The CholSS diet was unable to decrease the hepatomegaly and liver cholesterol levels induced by cholesterol feeding. Bocanegra et al. (2006) also found that liver



**Fig. 4.** GPx expression in liver homogenates of rats. The panel shows a representative gene expression profile of GPx assayed by RT-PCR analysis (GPx product of 260 bp). Control restructured pork diet (C); Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS); Control restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholC); Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholSS). The results, expressed as % expression of the control, are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Cholesterol  $\times$  alga interaction:  $p < 0.001$ , cholesterol effect:  $p < 0.001$ , alga effect:  $p < 0.001$ . CholC and CholSS values bearing asterisks (\*\*\*) were significantly different from C and SS values, respectively. S and CholSS values bearing a letter were significantly different ( $^b p < 0.05$ ;  $^a p < 0.01$ ) from C and SS values, respectively.



**Fig. 5.** GR expression in liver homogenates of rats. The panel shows a representative gene expression profile of GR assayed by RT-PCR analysis (GR product of 296 bp). Control restructured pork diet (C); Sea Spaghetti-restructured pork diet (SS); Control restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholC); Sea Spaghetti-restructured pork diet enriched in cholesterol and cholic acid (CholSS). The results, expressed as % expression of the control, are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Cholesterol  $\times$  alga interaction:  $p < 0.001$ , cholesterol effect:  $p = 0.411$ , alga effect:  $p = 0.050$ . CholC and CholSS values bearing asterisks (\*\*\*) were significantly different from C and SS values, respectively. S and CholSS values bearing a letter were significantly different ( $^c p < 0.001$ ) from C and SS values, respectively.

weight increased in rats fed diets enriched in cholesterol and algae. However, Wong et al. (1999) did not find any significant differences in the liver weights of rats given various diets containing algae and cholesterol.

The SS diet did not modify the cholesterolaemia, as observed in studies using diets containing algae but not cholesterol (Bocanegra et al., 2006; Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009). In



agreement with other authors (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009; Murata et al., 2002; Viejo et al., 2003), cholesterol supplementation induced hypercholesterolaemia in control rats. The CholSS diet partially blocked the effect of the hypercholesterolaemic agent. Previously, this research group found different effect of a Nori and Konbu supplement on rat cholesterolaemia (Bocanegra, Bastida, Benedi, Nus, et al., 2009) and also of Nori and Wakame when included in RP diets, as in this present study (Moreira et al., 2010). Plasma cholesterol levels decreased in rats fed a diet rich in sodium and cholesterol. Sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan were found to interact with dietary cholesterol to facilitate its excretion, whilst dietary agar was almost inactive (Jiménez-Escrig & Sánchez-Muniz, 2000).

As commented above, cholesterol is mainly eliminated from the body via bile acid production. Cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase is the rate-limiting enzyme in the synthesis of bile acid from cholesterol via the classic pathway, catalysing the formation of 7- $\alpha$ -hydroxycholesterol. CYP7A1 is a cytochrome P450 haeme enzyme that oxidises cholesterol using molecular oxygen (Cadenas & Davies, 2000). The data obtained on CYP7A1 expression clearly suggest that this pathway was increased to improve cholesterol elimination in CC animals, although this effect may induce oxidative stress through anion superoxide production (Cadenas & Davies, 2000). Present data on CYP7A1 expression in CholSS animals indicate that the cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase pathway was increased to improve cholesterol elimination in CholSS rats, but this would, in turn, increase ROS production.

As *Himanthalia elongata* is rich in polyphenols (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009), the liver antioxidant enzyme gene expression and activities were tested on SS and CholSS rats. The present results suggest that the SS diet affected the antioxidant status through an increase of the gene expression of almost all the studied antioxidant enzymes. However, enzyme activities and substrate concentrations, with the exception of GR and GSSG and the redox index, were not significantly affected. The increase in GR and the decrease in GSSG suggest a glutathione recycling that could be responsible for the drop in the redox index. In agreement with Murata et al. (2002), catalase activity was not affected after seaweed-enriched diet consumption but differs from that obtained in a previous study testing RP enriched in Nori and Wakame (Moreira et al., 2010). The current results for enzyme activities and expression seem contradictory; however, some studies suggest that these two parameters do not always follow a parallel course (Olivero-David et al., 2010; Sadi & Guray, 2009). Post-transcription events, such as translation and transport of gene products, and changes in the redox index involved in the activation of transcriptional factors, such as API or NF- $\kappa$ B (Liu, Hu, Chen, Stern, & Cheng, 2000) that participate in antioxidant enzyme expression, would be involved.

According to the high TBARS levels found, and coinciding with the findings of Lin, Yin, Hsu, and Lin (2004), the consumption of cholesterol-enriched diets induced oxidative stress. The increases in the GSSG levels and the redox index and decreases in the Se-GPx and total GPx and the GR activities and in the expression of CAT, Cu,Zn-SOD and GR also suggest the increase in the oxidative status of CholC rats.

Data also clearly suggest that the presence of both alga and cholesterol, compared with only cholesterol in the diet (CholSS vs CholC diet), clearly modifies and even reverses the expression of all enzymes except that of GR. These results are difficult to explain but seem related to the hypocholesterolaemic effects of the Sea Spaghetti. As previously commented, the present data on CYP7A1 expression in CholSS animals indicate that this pathway was

increased to improve cholesterol elimination in these rats. Theoretically, the higher the cholesterol elimination, the higher the radical production in the mitochondrion. The CholSS diet increased the activity and expression of GR as a mechanism to block the increase of GSSG induced by cholesterol feeding. In addition, according to our data, it can be speculated that the ROS induced by the cholesterol feeding and the conversion of cholesterol to cholic acid is partially blocked by the antioxidant properties of Sea Spaghetti. Very recently our group has found that the activity of arylesterase, an antioxidant enzyme, was negatively associated with the hypocholesterolaemic properties of a diet enriched in cholesterol that contained restructured meat treated with Nori (Olivero-David et al., 2011). All of these findings would explain why the gene expressions of SOD, CAT and GPx are decreased. Similarly, in a previous study, Moreira et al. (2010) observed that Nori showed hypocholesterolaemic properties when included in RP enriched in cholesterol and decreased the CAT and GPx expressions. However, Wakame, included in RP, did not show hypocholesterolaemic effects and decreased GR and GPx expressions but increased MnSOD expression. The mechanisms by which algae-cholesterol-enriched diets influence cholesterol levels and enzyme activities and expressions must be related to their polyphenol, fibre, mineral and fatty acid contents (Bocanegra, Bastida, Benedi, Rodenas, et al., 2009). Brown seaweeds display high phlorotannin concentrations (Glombitza & Keusgen, 1995), and polymeric phlorotannins inhibit enzymes implicated in radical species production (Shibata, Nagayama, Tanaka, Yamaguchi, & Nakamura, 2003; Kang et al., 2004). Phlorotannins have also been shown to exert hypolipemic activity (Yoon, Kim, Chung, & Choi, 2008), explaining the present results.

In conclusion, according to the present data, the CholSS diet shows hypocholesterolaemic properties with respect to the CholC diet and decreases the negative effect on enzyme expression of high cholesterol levels in the liver, leading to a better antioxidant status of this organ in growing rats.

## Acknowledgements

The present study was supported by the Spanish projects AGL2005-07204-C02-01/ALI, AGL-2008 04892-C03-02, and Consolider-Ingenio 2010 # CSD2007-00016. We acknowledge the predoctoral fellowship awarded to Adriana Schultz by the Universidad Complutense, Madrid, Spain, that of the Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) of the Bolivarian Republic of Venezuela to Raul Olivero and the foreign fellowship for studies granted by the Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres. All authors have significantly contributed to the paper and agree with the present version of the manuscript. FJ S-M is the corresponding author and Guarantor of the paper and has contributed to the study design, data discussion and writing of the paper. ARS M, L G-T, R O-D, and S B have contributed to the data acquisition and analysis and writing of the paper; J B, MJ G-M, and MI R have contributed to data discussion and have undertaken a critical review of the paper. All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986, for the protection of scientific research animals. The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Barga de Quiroga, G., Perez de Campo, R., & Lopez-Torres, M. (1990). Antioxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *The Biochemical Journal*, 272, 247–250.
- Bhandari, U., Jain, N., & Pillai, K. K. (2007). Further studies on antioxidant potential and protection of pancreatic  $\beta$ -cells by *Embellia ribes* in experimental diabetes. *Experimental Diabetes Research*, 2007, 15803.

- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12, 236–258.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Nus, M., Sanchez-Montero, J. M., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Effect of seaweed and cholesterol enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *British Journal of Nutrition*, 102, 1728–1739.
- Bocanegra, A., Benedi, J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2006). Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *British Journal of Nutrition*, 95, 696–702.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222–230.
- Canales, A., Sánchez-Muniz, F. J., Bastida, S., Librelotto, J., Nus, M., Corella, D., et al. (2011). Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increase cardiovascular risk. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65, 703–710.
- Canales, A., Benedi, J., Nus, M., Librelotto, J., Sánchez-Montero, J. M., & Sánchez-Muniz, F. J. (2007). Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 225–232.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156–159.
- Cofrades, S., López-López, I., Solas, M. T., Bravo, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science*, 79, 767–776.
- Cohen, J. C., Cali, J. J., Jelinek, D. F., Mehrabian, M., Sparkes, R. S., Lusi, A. J., et al. (1992). Cloning of the human cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11–q12. *Genomics*, 14, 153–161.
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25, 155–171.
- Ferreiro García, I. A., Acuña Castroviejo, R., & Duran Neira, C. (1993). *As algas en Galicia. Alimentación e outros usos. (The algae in Galicia. Nutrition and other uses)*. Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. España: Consellería de Pesca.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fukushima, M., Ohhashi, T., Ohno, S., Saitoh, H., Sonoyama, K., Shimada, K., et al. (2001). Effects of diets enriched in n-6 or n-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids*, 36, 261–266.
- Glombitza, K. W., & Keusgen, M. (1995). Fuhals and deshydroxyfuhals from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry*, 38, 987–995.
- Hamm, M. (1991). Meat as component of a balanced diet. *Fortschritte Der Medizin*, 109, 337–340.
- Hissin, P. F., & Hill, R. A. (1976). Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214–226.
- Ito, K., & Tsuchiya, Y. (1972). The effect of algal polysaccharides on the depressing of plasma cholesterol level in rats. In *Proceeding of the Seventh International Seaweed Symposium* (pp. 451–454). Tokyo: University Press.
- Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J., & Olmedilla-Alonso, B. Collaborators. (2010). Design and development of meta-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry*, 123, 959–967.
- Jiménez-Colmenero, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2006). New approaches for the development of functional meat products. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 275–308). Boca Raton, London, New York: Taylor and Francis Group.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Meat based functional foods. In Y. H. Hui, (associate Ed.), & Chandan et al. (Eds.), *Handbook of Food Products Manufacturing* (pp. 989–1015). New Jersey: John Wiley and Son, Inc.
- Jiménez-Escrig, A., & Goñi, I. (1999). Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles (Nutritional evaluation and physiological effects of edible marine algae). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49, 114–120.
- Jiménez-Escrig, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*, 20, 585–598.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Son, B. W., Nam, T. J., & Choi, J. S. (2004). Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Archives of Pharmaceutical Research*, 27, 1226–1232.
- Koseki, M., Tsuji, K., Kazama, M., Kitabatake, N., & Doi, E. (1990). Interaction between dietary cholesterol or fatty acids and water-soluble fibers and increase in cholesterol excretion by pectin in rats. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 559–564.
- Lawrence, R., & Burk, R. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7, 952–958.
- Lin, C. C., Yin, M. C., Hsu, C. C., & Lin, M. P. (2004). Effect of five cysteine containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/c mice consuming a high saturated fat diet. *Lipids*, 39, 843–848.
- Liu, T., Hu, C., Chen, Y., Stern, A., & Cheng, J. T. (2000). Differentiation status modulates transcription factor NF- $\kappa$ B activity in unstimulated human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters*, 151, 49–56.
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M. T., Sánchez-Muniz, F., et al. (2009). Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science*, 83, 492–498.
- Mahfouz, M. M., & Kummerow, F. A. (2000). Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 293–302.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Spain (2010). <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/ultimdatos.htm#art9>.
- Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autoxidation. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (pp. 243–247). Boca Raton: CRC Press Inc.
- Mihara, M., & Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86, 271–278.
- Moreira, A. S., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedi, J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2010). Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 290–298.
- Murata, M., Sano, Y., Ishihara, K., & Uchida, M. (2002). Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *Journal of Nutrition*, 132, 742–747.
- Naim, M., Morley, R., Kare, H., & Ingle, E. D. (1977). Sensory factors which affect the acceptance of raw and heated defatted soybeans by rats. *Journal of Nutrition*, 109, 1653–1658.
- Navas-Carretero, S., Perez-Granados, A. M., Schoppen, S., Sarria, B., Carbajal, A., & Vaquero, M. P. (2009). Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65, 165–174.
- Oben, J., Enonchong, E., Kuate, D., Mbanya, D., Thomas, T. C., Hildreth, D. J., et al. (2007). The effects of ProAlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids in Health and Disease*, 6, 20.
- Olivero-David, R., Bastida, S., Schultz, A., González-Torres, L., González-Muñoz, M. J., Sánchez-Muniz, F. J., et al. (2010). Fasting status and thermally oxidized sunflower oil ingestion affect the intestinal antioxidant enzyme activity and gene expression of male Wistar rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(58), 2498–2504.
- Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida, S., Benedi, J. et al. (2011). Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *British Journal of Nutrition* doi:10.1017/S000711451100198X.
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., et al. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs*, 8, 2038–2064.
- Paglia, D., & Valentine, W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158–169.
- Pandak, W. M., Schwarz, C., Hylemon, P. B., Mallonee, D., Valerie, K., Heuman, D. M., et al. (2001). Effects of CYP7A1 overexpression on cholesterol and bile acid homeostasis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281, G878–889.
- Punín Crespo, M. O., & Lage Yusty, M. A. (2004). Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himantalia elongata*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 57, 226–230.
- Ren, D., Noda, H., Amano, H., Nishino, T., & Nishizawa, K. (1994). Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fisheries Science*, 60, 83–88.
- Sadi, G., & Guray, T. (2009). Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin induced diabetes: Effect of antioxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 327, 127–134.
- Sanchez-Muniz, F. J., Cava, F., Viejo, J. M., Bastida, S., Higon, E., & Marcos, A. (1996). Olive oil-fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell-damage marker enzymes. *Nutrition Research*, 16, 111–121.
- Sanchez-Muniz, F. J., Garcia Linares, M. C., Garcia Arias, M. T., Bastida, S., & Viejo, J. (2003). Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrition*, 133, 2302–2308.
- Shibata, T., Nagayama, K., Tanaka, R., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. J. (2003). Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *Journal of Applied Phycology*, 15, 61–66.
- Viejo, J., García-Linares, M. C., Bastida, S., García-Arias, M. T., & Sánchez-Muniz, F. J. (2003). Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Science and Technology International*, 9, 329–338.
- Viejo, J. M. (1992). Utilización de sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de hipercolesterolemia experimental inducida por dieta (Olive oil fried sardines in the treatment of dietary induced hypercholesterolemia in the rat). PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Spain.
- Wong, K. H., Sam, S. W., Cheung, P. C. K., & Ang, P. O. (1999). Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutrition Research*, 19, 1519–1527.
- Yoon, N. Y., Kim, H. R., Chung, H. Y., & Choi, J. S. (2008). Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Archives of Pharmaceutical Research*, 31, 1564–1571.

**5.5. PUBLICACIÓN N°5.**

**Food and Chemical Toxicology** 56 (2013) 223–230. **ISI Web. JCR. (2012).** Índice impacto: 3,010 (12 de 124 en Food Science and Technology y 27 de 85 en Toxicology)

**Efectos de las dietas con reestructurados de cerdo enriquecidos con algas con o sin colesterol en la colesterolemia y daño hepático en ratas**

Adriana R. Schultz Moreira; Rosa A. García-Fernández; Aranzazu Bocanegra; M. Teresa Méndez; Sara Bastida; Juana Benedí; M. Isabel Sánchez-Reus; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** El reestructurado de carne de cerdo enriquecido con algas (RC) es un alimento potencialmente funcional. Sin embargo, se han reportado efectos adversos asociados con los fitofármacos, que incluyen entre otros insuficiencia hepática, hepatitis tóxica, y muerte. El colesterol añadido a la dieta produce hepatomegalia e infiltración grasa hepática. El efecto de las dietas con algas-RC, enriquecidas o no con colesterol, sobre el colesterol plasmático, marcadores de daño hepático, estructura, y expresión génica del citocromo CYP4A-1 se evaluaron después de 5 semanas. Ocho grupos de ratas fueron alimentadas con una mezcla de 85% AIN-93M + 15% del RC. Los grupos colesterol-control (CC), colesterol-Wakame (CW), el colesterol-Nori (CN) y colesterol-Espagueti de mar (CS), consumieron respectivamente dietas similares a las de los grupos control (C), Wakame (W), Nori (N), y espagueti de mar (S), pero con colesterol añadido a la dieta. Los grupos CN y CS bloquearon significativamente el efecto hipercolesterolémico observado en el grupo CC. Después de las 5 semanas, en los grupos N y S se incrementó la expresión génica de la CYP4A-1. Sin embargo, las dietas con RC enriquecidos en alga fueron incapaces de reducir las alteraciones histológicas del hígado observadas en el grupo CC. Se encontraron alteraciones hepatocelulares más grandes y más abundantes en CS y CN ratas, sugiriendo que los efectos hipocolesterolémicos de estos RC enriquecidos con algas parece ser un arma de doble filo, ya que incrementa el daño hepático. Son necesarios estudios futuros para entender los mecanismos implicados.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolaemia and liver damage

Adriana R. Schultz Moreira<sup>a</sup>, Rosa A. García-Fernández<sup>b</sup>, Aranzazu Bocanegra<sup>a</sup>, M. Teresa Méndez<sup>c</sup>, Sara Bastida<sup>a</sup>, Juana Benedí<sup>d</sup>, M. Isabel Sánchez-Reus<sup>c</sup>, Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain<sup>d</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 December 2012

Accepted 12 February 2013

Available online 24 February 2013

## Keywords:

Seaweed

Restructured pork

Functional foods

Cholesterol

Liver damage

Liver structure

## ABSTRACT

Seaweed enriched-restructured pork (RP) is a potential functional food. However, indications of adverse effects associated with herbal medications, which include among others liver failure, toxic hepatitis, and death have been reported. Cholesterol feeding produces hepatomegalia and fat liver infiltration. The effect of seaweed-RP diet, cholesterol-enriched or not, on plasma cholesterol, liver damage markers, structure, and cytochrome CYP4A-1 were evaluated after 5 wk. Eight rat groups were fed a mix of 85% AIN-93M rodent-diet plus 15% RP. The Cholesterol-control (CC), Cholesterol-Wakame (CW), Cholesterol-Nori (CN) and Cholesterol-Sea Spaghetti (CS) groups respectively consumed similar diets to control (C), Wakame (W), Nori (N), and Sea Spaghetti (S) but as part of hypercholesterolaemic diets. CN and CS significantly blocked the hypercholesterolaemic effect observed in CC group. After 5-wk, N and S diets increased the CYP4A-1 expression. However, seaweed-RPs were unable to reduce the histological liver alterations observed in CC group. Larger and more abundant hepatocellular alterations were found in CS and CN rats suggesting that the hypocholesterolaemic effects of these seaweed-RPs seem to be a two-edged sword as they increased liver damage. Future studies are needed to understand the involved mechanisms.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Functional foods represent a new category of products whose healthy properties have already made them very popular (Arvanitoyannis and van Houwelingen-Koukialiaroglou, 2005; Ashwell, 2002). Restructured pork (RP) is one of the most consumed meat derivatives and appears to be a suitable vector for including functional ingredients improving the “image” of the meat product by modifying its composition (i.e. saturated fat, cholesterol, and sodium) (Cofrades et al., 2008; Jiménez Colmenero et al., 2010). Seaweeds, as Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*) and Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*) have gained importance as foodstuffs in Western countries (Bocanegra et al., 2009; Mohamed et al., 2012). Seaweeds have been included as components of potentially functional meats or meat derivatives because their

consumption induces positive effects on cholesterolaemia, antioxidant status and adipose tissue enzyme expression (González-Torres et al., 2012; Olivero-David et al., 2011; Mišurcová et al., 2011; Moreira et al., 2010).

Our group found that cholesterol-enriched casein diets induced severe hypercholesterolemia and liver damage (Sánchez-Muniz et al., 1992, 1996). In addition, cholesterol feeding caused rat splenomegaly (Bastida et al., 2006) and hepatomegaly (Sánchez-Muniz et al., 2003; Viejo et al., 2003), which was reduced when the casein and olive oil in the diet was substituted by olive oil-fried sardines as the only source of protein and fat. Bocanegra et al. (2003, 2006) found that cholesterol feeding induced hypercholesterolaemia, liver fat infiltration and peroxidation in rats, which were partially checked by including 7% Nori in the diet, while Konbu was unable to do that. Similarly, differences in the hypolipaeamic and antioxidant properties of the seaweed-enriched RP-diets were attributed to differences in the seaweed composition (e.g. total and soluble dietary fibre, mineral, vitamin, and phytochemical content) of the Nori, Wakame, and Sea Spaghetti included in those RPs (González-Torres et al., 2012; Moreira et al., 2010; Olivero-David et al., 2011). Moreover, differences in the results of the studies by Bocanegra et al. (2006) and Moreira et al. (2010) also suggest that

**Abbreviations:** ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; C, control-group; CC, Cholesterol-control; CN, Cholesterol-Nori; CS, Cholesterol-Sea Spaghetti; CW, Cholesterol-Wakame; CYP4A-1, Cytochrome 4A-1; N, Nori; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RP, restructured pork; S, Sea Spaghetti; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; W, Wakame.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913941828; fax: +34 913941810.

E-mail address: [frasan@ucm.es](mailto:frasan@ucm.es) (F.J. Sánchez-Muniz).

0278-6915/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.028>

some meat compounds (e.g. iron, the meat matrix itself) can interact with seaweed compounds, which could explain those results.

Despite benefits already due to seaweeds consumption reported, indications of adverse effects associated with herbal medications, which include among others liver failure, toxic hepatitis, and death have been suggested (Ernst, 2003). Cytochrome 4A-1 (CYP4A-1) plays a role in detoxification (Tabrez and Ahmad, 2012) and could be a marker of liver protection, but no studies have been performed on animal models fed seaweed-enriched RP.

As hypercholesterolaemia and antioxidant status are recognized to play a central role in liver damage (Bocanegra et al., 2009; Sánchez-Muniz et al., 1992, 1996), the hypothesis of the present paper is that seaweed-enriched RP can partially check liver inflammation and structural tissue modification and damage. Moreover, the protective effects are different and depend on the seaweed included in the RP.

Thus, the objective of this paper was to evaluate the effect of a seaweed-RP diet, cholesterol-enriched or not, on (a) serum cholesterol, (b) liver damage markers (alkaline phosphatase, ALP; aspartate aminotransferase, AST; and alanine aminotransferase, ALT); (c) CYP4A-1 expression; and (e) liver histological changes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Wakame (*U. pinnatifida*), Nori (*P. umbilicalis*) and Sea Spaghetti (*H. elongata*) were obtained from a local supplier (Algamar C.B., Redondela, Pontevedra, Spain). These seaweeds were ground in a mill (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Germany), passed through a screen with an aperture of 0.25 mm and stored in plastic flasks at 4 ± 2 °C until used. Meat raw materials (post-rigor pork and pork back-fat), seaweeds and additives (sodium chloride, sodium tripolyphosphate and sodium nitrite) were used as reported by Cofrades et al. (2008). Table 1 gives information on protein, fat, soluble and insoluble fibre, and ash of the different RP employed for diet preparation.

### 2.2. Diet preparation and experimental design

Eight experimental semi-synthetic diets (Table 1) were prepared: (a) the control RP diet (C) contained 85% rodent feed (AIN-93M, purified rodent diet; Dyets #180729, DYETS, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 15% freeze-dried control RP to which 4% cellulose had been added; (b) the Wakame RP diet (W) consisted of a

mixture of AIN-93M #180729 feed (85%) and freeze-dried Wakame RP (15%); (c) the Nori RP diet (N) consisted of a mixture of AIN-93M #180729 feed (85%) and freeze-dried Nori RP (15%); (d) the Sea Spaghetti RP diet (S) consisted of a mixture of AIN-93M #180729 feed (85%) and freeze-dried Sea Spaghetti RP (15%); (e) the Cholesterol-control RP diet (CC) was identical to the C diet but with 2.43% cholesterol (95–98% purity) and 0.49% cholic acid (>98% purity) substituting an equal amount of starch (AIN-93M #180730 diet); (f) the Cholesterol-Wakame RP diet (CW) was the W diet enriched with cholesterol and cholic acid, and (g) the Cholesterol-Nori RP diet (CN) consisted of the N diet enriched with cholesterol and cholic acid; (h) the Cholesterol-Sea Spaghetti RP diet (CS) consisted of the S diet enriched with cholesterol and cholic acid.

Details of experimental diet composition are summarized in Table 1.

The experiments were approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986.

### 2.3. Animal maintenance and sampling

Eighty growing male Wistar rats with a body weight of approximately 90 g at the outset were obtained from Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona (Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room (22.3 ± 1.8 °C) with a 12 h light–dark cycle. Rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) for 1 wk to adapt to environmental conditions. The rats were later distributed into eight groups of 10 animals each, according to average body weight. Diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 4.2% total dietary fibre. Water and food were provided *ad libitum* over the 5-wk experimental period. At the end of the experiment, rats were anaesthetized, in fasting conditions, with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and euthanized by extracting blood from the descending aorta with a syringe, taking one animal at a time from each of the eight groups. The liver was removed and weighed. The hepatosomatic index was calculated as the percent contribution of liver weight to the animal weight. Liver was dissected and its major lobe snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C or stored in formalin prior to analysis.

### 2.4. Food consumption and body weights

Food intake was checked daily and body weight variations were measured on alternate days.

### 2.5. Plasma cholesterol

Plasma cholesterol was determined by the enzymatic colorimetric method of SPINREACT (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).

**Table 1**

Composition of the Control, Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*) and Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*) enriched restructured pork without or with supplementary cholesterol diets.<sup>a</sup>

	Without supplementary cholesterol				With supplementary cholesterol			
	Control	Wakame	Nori	Sea Spaghetti	Control	Wakame	Nori	Sea Spaghetti
Diet AIN-93M								
Maize starch	382.75	382.75	382.75	382.75	353.59	353.59	353.59	353.59
Cholesterol					24.31	24.31	24.31	24.31
Cholic acid					4.85	4.85	4.85	4.85
Pork (freeze-dried) <sup>b</sup> (g/kg diet)								
Control restructured pork <sup>b</sup>	150				150			
Wakame-, Nori- or Sea Spaghetti-restructured pork <sup>b</sup>		150	150	150		150	150	150
Soluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>		1.1	1.33	1.35		1.1	1.33	1.35
Insoluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>	2.81	1.2	0.66	1.46	2.81	1.2	0.66	1.46
Polyphenols (as gallic acid equivalent/100 g wet matter) <sup>c</sup>	Tr	820	2170	2570	Tr	820	2170	2570

AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate-H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate-9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate-12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806.

AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1%), 2.50; vitamin A palmitate (500 000 IU/g), 0.80; vitamin D3 (400 000 IU/g), 0.25; vitamin K1–dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

<sup>a</sup> Other ingredients (g/kg diet): casein, 127.5; soyabean oil, 34; dyetose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 131.75; sucrose, 85; microcrystalline cellulose, 42.5; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.53; t-butylhydroquinone, 0.0068.

<sup>b</sup> Protein (g), fat (g), minerals (g) (ash) and fibre (g) present in the 150 g of Control, Wakame, Nori and Sea Spaghetti freeze-dried restructured-pork; Control restructured pork: 76.99, 51.52, 15.61 and 4 (microcrystalline cellulose), respectively; Nori-restructured pork: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.0, respectively; Wakame-restructured pork: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.45; Sea Spaghetti restructured pork: 69.56, 51.25, 15.05 and 14.12.

<sup>c</sup> Data in restructured pork (source López-López et al., 2009).



## 2.6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of CYP4A-1

Liver tissue (100–150 mg) was homogenized and total RNA isolated, following the guanidinium thiocyanate/phenol reagent method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Reverse transcription and amplification, using the Titan system, involved the preparation of two master-mixes on ice. Master mix 1 was comprised of deoxy-nucleotide mix (dNTP), primers, dithiothreitol (DTT), and sterile pre-chilled deionized water. Master mix 2 consisted of RT-PCR buffer (MgCl<sub>2</sub> and DMSO), enzyme mix (AMV reverse transcriptase, Taq DNA polymerase), and sterile pre-chilled deionized water. Twenty-four µL of master mix 1, 25 µL of master mix 2, and 1 µg of extracted liver RNA were added to 0.2 mL PCR tubes kept on ice. This final mixture was vortexed and centrifuged briefly to collect the sample at the bottom of the tube, and RT was carried out at 50 °C for 30 min. β-actin cDNA was used as an internal control. The sequences of the primers were as follows:

CYP4A1 sense: 5' CTCTTACTTCGGAGAATGGAGAA 3'.  
CYP4A1 antisense: 5' GACTTGGATACCTTGGGTAAG 3'.  
β-Actin sense: 5' TACAACCTCTTGCAGCTCC 3'.  
β-Actin antisense: 5' GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC 3'.

The number of PCR cycles was adjusted to avoid saturation of the amplification system: 95 °C for 60 s, 60 °C for 60 s and 72 °C for 60 s (30 cycles); 94 °C for 30 s, 58 °C for 45 s and 72 °C for 30 s (24 cycles) for β-actin with a final elongation at 72 °C for 10 min. Amplification products were visualized on 1.8% agarose gels containing ethidium bromide (1 µg/mL): CYP4A1 product, 351 bp; β-actin product, 630 bp. A 100 bp DNA ladder was the marker used. The products were quantified by laser densitometry.

## 2.7. Liver damage markers

Plasma ALP, EC 3.1.3.1; AST, EC 2.6.1.1.; and ALT, EC 2.6.1.2. were analyzed using commercial kits according to the manufacturers instructions in a Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

## 2.8. Histological procedure

Specimens from the liver major lobe were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in alcohol gradient and xylene, embedded in paraffin, cut into 5 µm sections in a microtome (JUNG RM 2155, Leica®, Solms, Germany) and stained with haematoxylin and eosin. The histological evaluation was performed in each liver studying series of three sections per liver amplified at 4×, 10× and 20×, in a digital photomicroscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan) with a DP50 integrated camera (Olympus BX50, Tokyo, Japan).

**Table 2**

Food intake, bodyweight gain, feed conversion rate, liver weight, hepatosomatic index, plasma cholesterol, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in Wistar rats fed the control diet (C), the Wakame diet (W), the Nori diet (N), the Sea Spaghetti diet (S), Cholesterol-control diet (CC), Cholesterol-Wakame diet (CW), the Cholesterol-Nori diet (CN), and the Cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS).

	Added cholesterol	Control groups (C and CC)	Wakame groups (W and CW)	Nori groups N and CN	Sea Spaghetti group (S and CS)	ANOVA		
						Cholesterol effect	Diet effect	Interaction
Food intake (g/d)	No	19.09 ± 1.31 <sup>ab</sup>	19.31 ± 0.96 <sup>b</sup>	17.90 ± 1.19 <sup>a</sup>	17.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	<0.001	0.918	<0.001
	Yes	21.21 ± 1.22 <sup>ab***</sup>	21.13 ± 1.44 <sup>ab***</sup>	22.9 ± 1.12 <sup>b***</sup>	22.8 ± 0.93 <sup>b***</sup>			
Bodyweight gain(g)	No	192.0 ± 16.0 <sup>a</sup>	185.1 ± 18.9 <sup>a</sup>	172.8 ± 13.5 <sup>ab</sup>	163.7 ± 15.84 <sup>b</sup>	0.846	0.087	0.006
	Yes	184.3 ± 19.2	170.2 ± 15.5	190.2 ± 14.1 <sup>*</sup>	177.9 ± 23.4			
Feed conversion rate <sup>d</sup>	No	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.001	0.108	0.972
	Yes	0.20 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>***</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>*</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>**</sup>			
Liver weight (g)	No	8.93 ± 0.51	8.68 ± 1.06	8.64 ± 1.08	8.13 ± 0.93	<0.001	0.275	0.025
	Yes	16.9 ± 2.89 <sup>***</sup>	16.47 ± 2.05 <sup>***</sup>	18.3 ± 2.0 <sup>***</sup>	18.9 ± 2.5 <sup>***</sup>			
Hepatosomatic index <sup>e</sup>	No	2.87 ± 0.24	2.85 ± 0.26	2.96 ± 0.32	2.9 ± 0.29	<0.001	0.165	0.138
	Yes	5.51 ± 0.65 <sup>***</sup>	5.63 ± 0.48 <sup>***</sup>	5.77 ± 0.63 <sup>***</sup>	6.2 ± 0.72 <sup>***</sup>			
Plasma cholesterol (mg/dL)	No	59.55 ± 16.40	54.38 ± 8.85	52.62 ± 11.53	60.76 ± 6.53	<0.001	0.001	0.002
	Yes	236.90 ± 57.87 <sup>ab***</sup>	195.74 ± 95.66 <sup>ab***</sup>	114.03 ± 54.31 <sup>b**</sup>	120.72 ± 41.28 <sup>b**</sup>			
ALP (IU/L)	No	93.88 ± 13.71	88.50 ± 15.59	82.62 ± 23.70	69.50 ± 23.21	<0.001	0.496	0.503
	Yes	166.88 ± 32.08 <sup>***</sup>	154.75 ± 38.36 <sup>***</sup>	165.57 ± 19.83 <sup>***</sup>	162.67 ± 34.44 <sup>***</sup>			
ALT (IU/L)	No	57.12 ± 64.48	50.88 ± 34.54	34.50 ± 38.66	44.25 ± 54.77	<0.001	0.083	0.019
	Yes	82.62 ± 48.38 <sup>a</sup>	97.25 ± 54.37 <sup>ab</sup>	169.86 ± 43.11 <sup>ab***</sup>	218.11 ± 158.89 <sup>b*</sup>			
AST (IU/L)	No	159.00 ± 112.37	142.50 ± 61.57	122.63 ± 102.70	140.00 ± 124.82	<0.001	0.277	0.146
	Yes	256.38 ± 122.61	237.38 ± 134.30	369.43 ± 88.00 <sup>***</sup>	428.55 ± 286.05 <sup>*</sup>			
ALT/ALP	No	0.51 ± 0.67	0.49 ± 0.47	0.37 ± 0.50	0.70 ± 1.31	0.122	0.260	0.478
	Yes	0.40 ± 0.42	0.48 ± 0.32	0.73 ± 0.57	1.19 ± 0.97			

<sup>abc</sup>Values (mean ± SD, n = 10) in the same row bearing different letters were significantly different (p < 0.05). Values for the same diet but with different cholesterol contents bearing asterisks were significantly different (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). <sup>d</sup>Bodyweight gain (g)/food intake (g). <sup>e</sup>100 × liver weight (g)/bodyweight (g). For details of diet composition see Table 1 and Section 2 section.

To quantify the number of portal lymphoid and parenchymal lymphoid aggregates, coagulation necrosis, necro-inflammatory focus, portal inflammation, mitosis, apoptosis, haemorrhage focus, fatty cysts, and multinucleated cells, ten fields of each preparation were observed at 40× magnification. Hydropic degeneration, vacuolar and fatty degenerations were scored on a lesion scale as follows: 1 = 0–10%, 2 = 10–30%, 3 = 30–60%, 4 = 50–80%, 5 = 80–100%. Individual cell necrosis, necro-inflammatory focus, and inflammatory cells, and megalocytes were scored according to lesion as follows: 1 = mild; 2 = moderate; 3 = marked; 4 = very marked. For vacuolar-type the scale was: 1 = multivacuolar; 2 = multivacuolar with some univacuolar.

## 2.9. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the SPSS version 15.0 statistical analysis packages. Differences were accepted as significant when p ≤ 0.05. Data of food consumption, weight gain, liver weight, plasma cholesterol, liver damage markers, liver CYP4A-1, and liver histological study (portal lymphoid aggregates, parenchymal lymphoid aggregates, coagulation necrosis, necro-inflammatory focus, portal inflammation, apoptosis, mitosis, haemorrhage, fatty cysts, multinucleated cells) were analyzed by two-way ANOVA to ascertain possible algal-cholesterol interactions. The effect of each factor was then tested separately; one-way ANOVA followed by Tukey Post Hoc study was employed to compare diet type effect (C, N, W, and S or CC, CN, CW, and CS), while the dietary cholesterol effect was tested by Student t-test (C vs. CC; N vs. NC; W vs. CW and S vs. CS groups). Parameters not presenting normal distribution in the histological study (hydropic degeneration, vacuolar degeneration, individual cell necrosis, vacuolar-type, fatty degeneration, necro-inflammatory focus and inflammatory cells, and megalocytes) were compared by the MonteCarlo exact bilateral signification method. Subsequently, the groups were pair wise compared using the Fisher exact statistical test.

## 3. Results

### 3.1. Food intake, feed conversion rate, body-weight gain, liver weight and hepatosomatic index

Table 2 shows the effect of alga and dietary cholesterol on food intake, feed conversion rate, body-weight gain, liver weight and hepatosomatic index. Significant cholesterol/diet type interactions were observed in food intake (p < 0.001), body-weight gain (p = 0.006) and liver weight (p < 0.025). Body weight gain decreased in the S and N groups (p < 0.01) vs. C group but increased in CN vs. N (p < 0.05). Cholesterol effect significantly affected food

intake, feed conversion rate, liver weight, and the hepatosomatic index (all,  $p \leq 0.001$ ).

### 3.2. Plasma cholesterol

Plasma cholesterol was significantly affected by dietary cholesterol/diet type interaction ( $p = 0.002$ ), and by the presence of alga and cholesterol (both  $p \leq 0.001$ ). Cholesterol in the diet significantly increased plasma cholesterol in CC ( $p < 0.001$ ), CW, CN and CS (all  $p < 0.01$ ) animals. CN and CS rats showed significantly lower cholesterol ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  respectively) than CC rats (Table 2).

### 3.3. Liver damage markers

Table 2 shows that ALT was significantly affected by cholesterol/diet type interaction ( $p = 0.019$ ). ALP, ALT, and AST were significantly affected by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ). Dietary inclusion of cholesterol significantly increased ALP in CC, CW, CN, and CS vs. C, W, N, and S respectively (all  $p < 0.001$ ), and the ALT and the AST activity in CN ( $p < 0.001$ ) and CS groups ( $p < 0.05$ ) with respect to N and S rats respectively. The ALT/ALP ratio was not significantly affected ( $p > 0.1$ ) by dietary cholesterol/diet type interaction or the presence of alga and cholesterol.

### 3.4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of CYP4A-1

S and N diets significantly increased ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  respectively) the CYP4A-1 expression vs. C diet. CYP4A-1 expressions were significantly reduced in CS and CN ( $p < 0.001$ ) and CW ( $p < 0.05$ ) rats vs. S, N, W rats respectively (Fig. 1).

### 3.5. Histological liver changes

Tables 3 and 4 summarize major histological changes due to seaweed-RP and cholesterol ingestion. Table 3 shows that parenchymal lymphoid aggregates and coagulation necrosis were found only in non-cholesterol-fed rats while fatty cysts and multinucleated cells were found only in cholesterol-fed rats. A significant cholesterol/diet type interaction was found in the mitosis number ( $p = 0.05$ ); CC vs. C and CN versus N groups showed a tendency to decrease while in CS vs. S and CW vs. W groups showed a tendency for the mitosis number to increase.

Portal lymphoid aggregates, necro-inflammatory focus, and portal inflammation were significantly affected by cholesterol feeding ( $p < 0.001$ ). The type of diet did not significantly affect those parameters ( $p > 0.05$ ). The presence of necro-inflammatory focus ( $p < 0.05$ ), and portal inflammation ( $p < 0.05$ ) were affected by cholesterol feeding in all groups, while portal lymphoid aggregates increased in CC vs. C, CN vs. N and CS vs. S ( $p < 0.05$ ).

Table 4 shows that among non-cholesterol-fed rats there were differences in hydropic degeneration (N vs. C and S vs. C groups), while in the cholesterol-fed rats CC and CN displayed significantly lower fatty degeneration ( $p < 0.05$ ) than CW and CS livers.

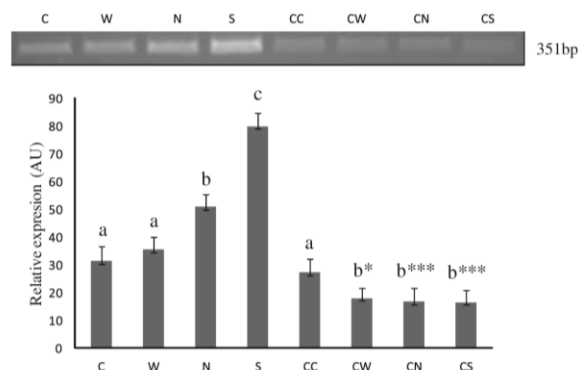
## 4. Discussion

The experiment was designed to analyze medium-long-term effects of seaweed-RP ingestion on cholesterolaemia and liver structure.

Diets containing control-RP or seaweed-RP with or without added cholesterol were relatively well-accepted by growing Wistar rats. However, feed consumption of N- and S-RP diets was lower, probably due to their higher soluble fibre content (Bocanegra

et al., 2003; Cofrades et al., 2008) with respect to the control-RP. Some human and animal studies have reported that soluble fibre consumption is associated with altered circulation levels of the anorexigen hormone peptide YY (Beck et al., 2010) and leptin (Young et al., 2012). However, for unknown reasons those theoretical algal anorexigen properties were lost when supplementary dietary cholesterol was consumed. As a consequence of the lower feed consumption, rats on the N and S diets tended to gain less bodyweight. Terpend et al. (2012) reported that consuming *Ascochyllum nodosum*, 40 and 400 mg/kg/day, as part of a fat-enriched diet reduced the bodyweight gain by 22% and 31.8% respectively compared with the respective controls, results similar to those found by Park et al. (2012) in a study of brown alga as part of a diet highly enriched in fat. Results were probably related to the lower energy bioavailability of algae (Bocanegra et al., 2009) and their high polyphenolic content, especially Sea Spaghetti (Cofrades et al., 2010).

As in other studies, the hypercholesterolaemic agent (cholesterol plus colic acid) together with dietary casein increased plasma cholesterol (Bocanegra et al., 2006, 2008, 2009; Sánchez-Muniz and Bastida, 2008; Thiruchenduran et al., 2011). CS and CN diets significantly blocked the hypercholesterolaemic effects of the added cholesterol. Previous results of our group suggest the existence of a linear relationship between time-consumption of cholesterol enriched-diet and cholesterolaemia in growing Wistar rats (Viejo et al., 2003). In the case of CC, plasma cholesterol increased 4-fold while in CS and CN it only increased 2-fold. Sea Spaghetti and Nori contain more soluble fibre (Gómez-Ordóñez et al., 2010) and polyphenols (Bocanegra et al., 2009; Dawczynski et al., 2007) than Wakame, all of which factors are thought to exert



**Fig. 1.** CYP4A-1 expression in rat liver homogenates. The panel shows a representative gene expression profile of CYP4A1 assayed by RT-PCR analysis (CYP4A-1 product of 351 bp). C, Control diet; W, Wakame diet; N, Nori diet; S, Sea Spaghetti diet; CC, Cholesterol-control diet; CW, Cholesterol-Wakame diet; CN, Cholesterol-Nori diet; CS, Cholesterol-Sea Spaghetti diet. The results, expressed as arbitrary units (AUs), are the means  $\pm$  SD of 10 animals per group. Dietary cholesterol-type of diet interaction:  $p = 0.003$ , cholesterol effect:  $p < 0.001$ , alga effect:  $p = 0.203$ . C, W, N and, S or CC, CW, CN, and CS bars bearing different letters were significantly different (at least  $p < 0.05$ ). CC, CW, CN, and CS bars bearing asterisks were significantly different than C, W, N, and S, respectively (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

hypocholesterolaemic effects. Jiménez-Escrig and Sánchez-Muniz (2000) reported that some algal fibre (e.g. the sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan) interact with dietary cholesterol to facilitate its excretion, while dietary agar was almost inactive.

As observed in Fig. 2 livers from C rats presented normal histological characteristics according to their lobulillar and portal space structures. At higher magnification all cellular elements of the liver are in the correct proportion and show typical characteristics.

**Table 3**

Histological changes in liver of rats fed the control diet (C), the Wakame diet (W), the Nori diet (N), the Sea Spaghetti diet (S), Cholesterol-control diet (CC), Cholesterol-Wakame diet (CW), the Cholesterol-Nori diet (CN), and the Cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS).

	Added Cholesterol	Control groups (C and CC)	Wakame groups (W and CW)	Nori groups (N and CN)	Sea Spaghetti group (S and CS)	ANOVA		
						Cholesterol effect	Diet effect	Interaction
Portal lymphoid aggregates	No	0.10 ± 0.12a	0.80 ± 0.62b	0.10 ± 0.12a	0.60 ± 0.37ab	<0.001	0.105	0.152
	Yes	1.00 ± 0.45*	0.80 ± 0.53	0.80 ± 0.43*	1.20 ± 0.48*			
Parenchymal lymphoid aggregates	No	0.50 ± 0.27	0.40 ± 0.20	0.40 ± 0.17	0.30 ± 0.18	ND	0.970+	ND
	Yes	ND	ND	ND	ND			
Coagulation necrosis	No	0.50 ± 1.08	0.10 ± 0.32	1.00 ± 1.63	0.80 ± 1.32	ND	0.369+	ND
	Yes	ND	ND	ND	ND			
Necroinflammatory foci	No	0.0 ± 0.0	0.10 ± 0.32	0.10 ± 0.32	0.0 ± 0.0	<0.001	0.769	0.760
	Yes	26.9 ± 15.3*	20.3 ± 10.5 *	23.8 ± 10.1*	34.2 ± 11.2*			
Portal inflammation	No	0.33 ± 0.50	0.44 ± 0.53	0.30 ± 0.67	0.90 ± 0.88	<0.001	0.889	0.432
	Yes	4.27 ± 2.49***	4.90 ± 2.85*	4.50 ± 1.90***	3.60 ± 2.27*			
Apoptosis	No	0.22 ± 0.24	0.44 ± 0.43	0.50 ± 0.47	0.50 ± 0.38	0.493	0.492	0.605
	Yes	0.54 ± 0.49	0.20 ± 0.20	0.50 ± 0.45	1.00 ± 0.79			
Mitosis	No	1.67 ± 1.34	0.44 ± 0.53	2.70 ± 2.55	0.80 ± 0.70	0.973	0.427	0.050
	Yes	0.64 ± 0.47	0.80 ± 0.52	1.00 ± 0.85	2.70 ± 2.00			
Hemorrhagic foci	No	1.11 ± 2.03	0.11 ± 0.33	0.90 ± 1.45	0.70 ± 1.25	0.502	0.376	0.776
	Yes	0.91 ± 1.37	0.60 ± 1.07	0.90 ± 1.29	1.20 ± 0.92			
Fatty cysts	No	ND	ND	ND	ND	ND		ND
	Yes	1.64 ± 1.56	1.80 ± 1.08	3.20 ± 2.71	1.80 ± 1.57		0.609+	
Multinucleated cells	No	ND	ND	ND	ND	ND		ND
	Yes	3.18 ± 2.92	1.80 ± 1.46	3.20 ± 2.32	1.80 ± 1.53		0.782+	

Values are Mean ± SD of 10 rats in each group. ND, not determined; +Diet effect comparing C,W, N, S or CC, CW, CN and CS (ANOVA-one way). Data on the same row bearing unlike letters were significantly different (at least  $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  comparison between data for the same parameter and group between added and non-added cholesterol diets. For details see text.

**Table 4**

Histological changes in liver of Wistar rats fed the control diet (C), the Wakame diet (W), the Nori diet (N), the Sea Spaghetti diet (S), Cholesterol-control diet (CC), Cholesterol-Wakame diet (CW), the Cholesterol-Nori diet (CN), and the Cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS).

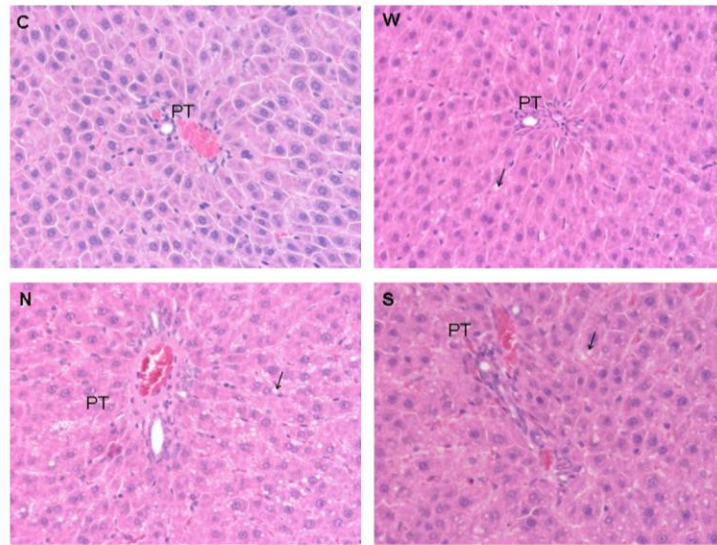
	Added cholesterol	Control groups (C and CC)					Wakame groups (W and CW)					Nori groups (N and CN)					Sea Spaghetti group (S and CS)					C vs W (p)	C vs N (p)	C vs S (p)	W vs (p)N	W vs S (p)	N vs S (p)
Alteration score		1	2				1	2				1	2				1	2				NS	NE	NE	NS	NS	NE
Vacuolar-type	No	0	10				1	9				0	10				0	10									
	Yes	ND					ND					ND					ND										
Alteration score		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5						
Hydropic degeneration	No	9	1	0	0	0	4	3	3	0	0	7	3	0	0	0	5	5	0	0	0	NS	0.02	0.03	NS	NS	NS
	Yes	ND					ND					ND					ND										
Vacuolar degeneration	No	7	3	0	0	0	7	3	0	0	0	6	3	1	0	0	8	2	0	0	0	NE	NS	NS	NS	NS	NS
	Yes	ND					ND					ND					ND										
Fatty degeneration	No	ND					ND					ND					ND					0.05	NE	0.04	0.03	NS	0.02
	Yes	0	0	0	8	2	0	0	0	3	7	0	0	0	8	2	0	0	1	2	7						
Alteration score		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4							
Individual cell necrosis	No	8	2	0	0		7	3	0	0		8	2	0	0		8	2	0	0		NS	NE	NE	NS	NS	NE
	Yes	ND					ND					ND					ND										
Necroinflammatory focus and inflammatory cells	No	ND					ND					ND					ND					NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Yes	6	2	2	0		6	2	1	1		3	3	3	1		1	5	3	1							
Megalocytes	No	ND					ND					ND					ND					NE	NE	NE	NE	NE	NE
	Yes	10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0		10	0	0	0							

Values are number of rats presenting the specific alteration degree. For vacuolar-type the scored was: 1 = multi vacuolar; 2 = multi vacuolar with some univacuolar. Hydropic degeneration, vacuolar and fatty degenerations were scored according to alteration degree: 1 = 0–10%; 2 = 10–30%; 3 = 30–60%; 4 = 50–80%; 5 = 80–100%. Individual cell necrosis, necro-inflammatory focus and inflammatory cells, and megalocytes were scored according to lesion as follows: 1 = mild; 2 = moderate; 3 = marked; 4 = very marked. ND: No determined alteration; NE: no evaluated (identical). (p) Significance at the MonteCarlo/Fisher statistical tests.

Polygonal hepatocytes show a eucromatic nucleus, placed at the cell equator, with a clear nucleolus. The proportion of binuclei hepatocytes appears normal. The cytoplasm, finely vacuolated, shows a different degree of eosinophilia depending on its functional activity. Kupffer cells placed at sinusoidal level do not suggest macrophagic mobilization. The canalicular system showed a normal cubic epithelium. Histological characteristics (Tables 3 and 4) show that the degrees of hydropic and vacuolar

degeneration and individual necrosis, were small and appropriate for normal young growing rats. However, significantly higher hydropic degeneration, mainly in the centrolubulillar zone, was found in N and S groups, while the incidence of portal lymphoid aggregates slightly but significantly increased in the case of W rats. Bocanegra et al. (2003) observed non-dense glycogen-like vacuoles in the hepatocyte cytoplasm of Nori fed rats but not in those of Konbu-fed rats, and related their results to glucose absorption.



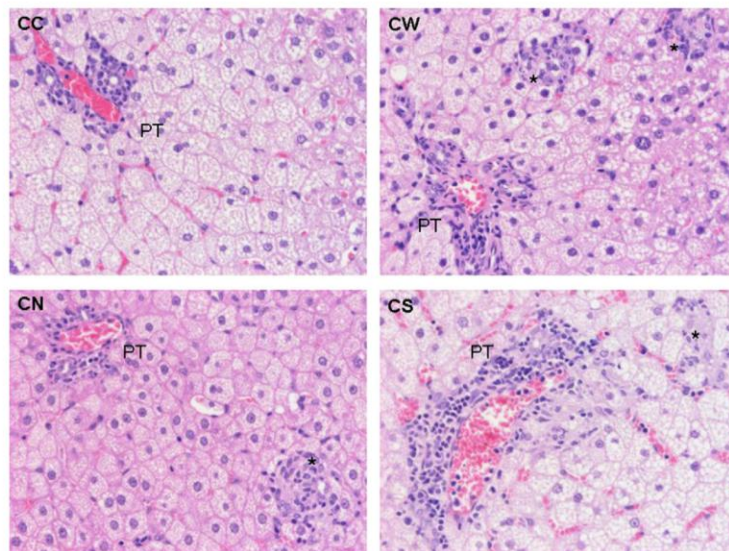


**Fig. 2.** Effect of experimental diets on rat liver histological changes. C, Control diet; W, Wakame diet; N, Nori diet; S, Sea Spaghetti diet. PT, portal triads. Intracytoplasmic vacuoles (→) (vascular degeneration) in hepatocytes are more frequent in N and S rats than in C counterparts. Few vacuoles were seen in W rats. Haematoxylin and eosin stain ( $\times 20$ ). Shown figure is a representative sample of a series of three sections per liver of 10 animals per group. For details of diets and procedures, see Material and methods.

Unpublished data from our group suggest that water, chloroform, and ethanol extracts of Nori, Wakame, and Sea Spaghetti induce differential effects on  $\alpha$ -glucosidase activity and glucose diffusion through the membrane. In cholesterol-fed rats the increase of intracytoplasmic lipids leads to proinflammatory processes. For instance, necro-inflammatory foci observed in cholesterolaemic rats were larger and more abundant than in non-cholesterol fed rats. Supplementation with dietary cholesterol resulted in hepatomegaly, steatosis and increased the hepatosomatic index in the rats, as shown by others (Bocanegra et al., 2006, 2008; Fukushima

et al., 2001; Sánchez-Muniz et al., 2003). Seaweed-RP were unable to reduce the hepatomegaly induced by cholesterol feeding. These results agree with previous ones in rats fed an alga-diet supplemented with cholesterol (Bocanegra et al., 2003, 2006) or fried sardine-diets supplemented with cholesterol (Sánchez-Muniz et al., 1992, 1996).

Portal lymphoid aggregates seemed to increase in all hypercholesterolaemic groups. Although the cell constituents of those aggregates were lymphocytes, in new necrotic foci a small number of neutrophils were also observed in sinusoids. Unexpectedly, the



**Fig. 3.** Effect of experimental diets on rat liver histological changes. CC, Cholesterol-control diet; CW, Cholesterol-Wakame diet; CN, Cholesterol-Nori diet; and CS, Cholesterol-Sea Spaghetti diet. PT, portal triads. Fatty degeneration with abundant intracytoplasmic vacuoles were observed in all rats, although vacuoles in CW and CS rats were larger than in CC and CN rats. Note that portal inflammation is significantly higher than in non-added cholesterol groups. (\*) Multifocal necro-inflammatory aggregates can be observed in liver parenchyma. Hematoxylin and eosin stain ( $\times 20$ ). Shown figure is a representative sample of a series of three sections per liver of 10 animals per group. For details of diets and procedures, see Section 2.

seaweed-RP diets did not diminish the liver injury induced by the CC diet. Bocanegra et al. (2003, 2006) found a decrease of liver fat infiltration in rats fed a supplement of 7% Nori, which was not achieved with Konbu. These results could be due to differences in study design (length of experiments, seaweed concentrations, and use or not of meat-matrix in diet).

Cholestasis and hepatocellular damage were observed in all cholesterol-enriched meat groups, mainly the CS and CN groups, although no bile duct hyperplasia was found. These results are consistent with the fact that levels of ALT and AST were highest in those groups. It can be hypothesized that the greater decrease in cholesterolaemia observed in the CS and CN groups due to the decrease of  $\beta$ -VLDL synthesis (Olivero-David et al., 2011; Schultz-Moreira et al., unpublished data) would imply that large amounts of cholesterol are able to enter the bile, contributing to cholesterol deposition in bile ducts and thus to the cholestasis observed.

Also, moderate to severe fatty degeneration was found in all cholesterol-RP-enriched groups (Fig. 3). Some rats showed multifocal lipogranulomas and varying numbers of macrophagic multinucleated cells containing fat droplets. Although close to the centrolobulillar vein, hepatocytes appeared less altered and vacuolized, and megalocytes and mitosis were more frequently found in this area. Livers of CN and CS rats tended, although not significantly, to show larger numbers of mitosis than CC rats. Our group has found increased incidence of liver mitosis in rats showing hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increment (López-Varela et al., 1995). Previously, in the same animal experiment, in view of the observed increase of CYP7A1 gene expression, we suggested that the higher the cholesterol elimination is, the higher the radical production in the liver mitochondrion will be (Schultz Moreira et al., 2011). CYP7A1 is a cytochrome P450 haeme enzyme that oxidizes cholesterol to cholic acid using molecular oxygen (Cadenas and Davies, 2000). Thereby, the CN and CS diets may induce a tendency to increase liver free radicals as they are highly hypocholesterolaemic.

CYP4A-1 is considered a marker of liver detoxification capacity as increment of this cytochrome expression has been reported after the ingestion of some xenobiotics (Pan et al., 2002). However, fatty acids, eicosanoids, and some hypolipemic drugs as clofibrate are major substrates for this CYP4A-1 (Santiago et al., 2002). In the present results, S diet, and to a lesser extent N diet, increased the CYP4A-1 expression observed in the C diet several fold. Seaweeds are rich in polyphenols and trace elements, and moderately rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) partially explaining the present CYP4A-1 results. However, those effects were lost when diets supplemented with cholesterol were consumed. Similarly, Orolin et al. (2009) found a decrease of CYP4A-1 in Wistar-Kyoto rats fed cholesterol. Unpublished data of our group suggest that the absorption of As is increased in cholesterol fed animals (ca. 25%), thus, the potential deleterious effects of trace elements from seaweed-RP diets should not be discarded and should be researched in future studies.

The delta-6 desaturase/elongase is a key enzyme that control very long-PUFA synthesis. This enzyme activity is largely inhibited in hypercholesterolaemia (Das, 2006) explaining; at least in part, the decrease observed in CYP4A-1 expression on CW, CN and CS rats. As in previous studies (Sánchez-Muniz et al., 1992, 1996), liver damage markers clearly increased after cholesterol feeding. Paradoxically, the most powerfully hypocholesterolaemic diets (CN and CS) increased ALT and AST levels more, suggesting greater hepatocellular damage in those rats. It can also be speculated that the increase in liver damage markers may be related to the loss of protection via CYP4A-1 expression in CN and CS vs. N and S rats respectively, as the decrease of CYP4A-1 in CW and CC groups was much smaller. These facts were corroborated in Fig. 3, as the

hepatocellular injury tended to be higher in CN and CS rats than in CW and CC groups.

## 5. Conclusion

In summary, the ingestion of seaweed-RP-enriched diets without added cholesterol did not greatly alter the plasma cholesterolaemia and liver structure. Nori-RP and Sea spaghetti-RP clearly blocked the hypercholesterolaemic effects of the dietary cholesterol but were unable to reduce the incidence of various liver alterations and even increased hepatocellular damage. More studies are needed to ascertain the utility of consuming algal-RP as part of very cholesterol-rich diets.

## Conflict of Interest

The authors declare that there are not conflict of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by the Spanish project AGL-2011-29644-C02-02 and Consolider-Ingenio 2010 #CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the predoctoral fellowship awarded to Adriana Schultz Moreira by the Universidad Complutense, Madrid, Spain.

## References

- Arvanitoyannis, I.S., van Houwelingen-Koukialiaroglou, M., 2005. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 385–404.
- Ashwell, M., 2002. Concepts of functional foods. In: ILSI Europe Concise Monograph Series. International Life Sciences Institute, Brussels, 18, pp. 567–578.
- Bastida, S., García-Linares, M.C., Viejo, J., García-Arias, M.T., Sánchez-Muniz, F.J., 2006. Effect of olive oil-fried sardine consumption on the cholesterol content of serum, lipoprotein, spleen and adipose tissue of hypercholesterolemic rats. *Ann. Nutr. Metab.* 50, 54–58.
- Beck, E.J., Tapsell, L.C., Batterham, M.J., Tosh, S.M., Huang, X.F., 2010. Oat beta-glucan supplementation does not enhance the effectiveness of an energy-restricted diet in overweight women. *Br. J. Nutr.* 103, 1212–1222.
- Bocanegra, A., Nieto, A., Blas, B., Sánchez-Muniz, F.J., 2003. Diets containing a high percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1473–1480.
- Bocanegra, A., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F.J., 2006. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br. J. Nutr.* 95, 696–702.
- Bocanegra, A., Nieto, A., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F.J., 2008. A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 99, 272–280.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F.J., 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food* 2, 236–258.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cofrades, S., López-López, I., Solas, M.T., Bravo, L., Jiménez-Colmenero, F., 2008. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci.* 79, 767–776.
- Cofrades, S., López-López, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M.T., Jiménez-Colmenero, F., 2010. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci. Technol. Int.* 5, 361–370.
- Das, U.N., 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol. J.* 1, 420–439.
- Dawczynski, C., Schäfer, U., Leiterer, M., Jahreis, G., 2007. Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultratrace elements in algae food products. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10470–10475.
- EEC. European Community, 1986. Directive 86/609/ of November 24.
- Ernst, E., 2003. Serious adverse effects of unconventional therapies for children and adolescents: a systematic review of recent evidence. *Eur. J. Pediatr.* 162, 72–80.
- Fukushima, M., Ohhashi, T., Ohno, S., Saitoh, H., Sonoyama, K., Shimada, K., Sekikawa, M., Nakano, M., 2001. Effects of diets enriched in  $n-6$  or  $n-3$  fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* 36, 261–266.



- Gómez-Ordóñez, E., Jimenez-Escrig, A., Ruperez, P., 2010. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res. Int.* 43, 2289–2294.
- González-Torres, L., Churrua, I., Schultz Moreira, A.R., Bastida, S., Benedí, J., Portillo, M.P., Sánchez-Muniz, F.J., 2012. Effects of restructured pork containing *Himanthalia elongata* on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo- and hypercholesterolemic rats. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 5, 158–167.
- Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J., Olmedilla-Alonso, B., 2010. Design and development of meat-based functional foods with walnut: technological, nutritional and health impact. *Food Chem.* 123, 959–967.
- Jiménez-Escrig, A., Sánchez-Muniz, F.J., 2000. Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* 20, 585–598.
- López-Lopez, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M.T., Sánchez-Muniz, F.J., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., 2009. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci.* 83, 492–498.
- López-Varela, S., Sánchez-Muniz, F.J., Cuesta, C., 1995. Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. *Food Chem. Toxicol.* 33, 181–189.
- Mišurcová, L., Machů, L., Orsavová, J., 2011. Advances in food and nutrition research: marine medicinal foods: implications and applications, macro and microalgae. In: Se-Kwon, K. (Ed.), *Seaweed Minerals as Nutraceuticals*. Marine Bioprocess Research Center, Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan, pp. 371–386.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A., 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 83–96.
- Moreira, A.S., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F.J., 2010. Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 290–298.
- Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J., 2011. Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 106, 1476–1486.
- Orolin, J., Vecera, R., Markova, I., Zacharova, A., Anzenbacher, P., 2009. Differences in hepatic expression of genes involved in lipid homeostasis between hereditary hypertriglyceridemic rats and healthy Wistar rats and in their response to dietary cholesterol. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2624–2630.
- Pan, J., Xiang, Q., Renwick, A.B., Price, R.J., Ball, S.E., Kao, J., Scatina, J.A., Lake, B.G., 2002. Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica* 32, 739–747.
- Park, E.Y., Kim, E.H., Kim, M.H., Seo, Y.W., Lee, J.I., Jun, H.S., 2012. Polyphenol-rich fraction of brown alga *Ecklonia cava* collected from Gijang, Korea, reduces obesity and glucose levels in high-fat diet-induced obese mice. *Evid. Complement. Alternat. Med.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/418912>.
- Sánchez-Muniz, F.J., Bastida, S., 2008. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 295–301.
- Sánchez-Muniz, F.J., Higón, E., Cava, F., Viejo, J.M., 1992. Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower-oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2226–2231.
- Sánchez-Muniz, F.J., Cava, F., Viejo, J.M., Bastida, S., Higón, E., Marcos, A., 1996. Olive oil-fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell-damage marker enzymes. *Nutr. Res.* 16, 111–121.
- Sánchez-Muniz, F.J., García Linares, M.C., García Arias, M.T., Bastida, S., Viejo, J., 2003. Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.* 133, 2302–2308.
- Santiago, C., Bandrés, F., Gómez-Gallego, F., 2002. Polimorfismos de citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Med. Trabajo* 11, 130–140.
- Schultz Moreira, A.R., Benedí, J., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Sánchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J., 2011. Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem.* 129, 1623–1630.
- Tabrez, S., Ahmad, M., 2012. Cytochrome P450 system as potential biomarker of certain toxicants: comparison between plant and animal models. *Environ. Monit. Assess.* <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-012-2765-z>.
- Terpend, K., Bisson, J.F., Le Gall, C., Linares, E., 2012. Effects of ID-aIG™ on weight management and body fat mass in high-fat-fed rats. *Phytother. Res.* 5, 727–733.
- Thiruchenduran, M., Vijayan, N.A., Sawaminathan, J.K., Devaraj, S.N., 2011. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc. Pathol.* 20, 361–368.
- Viejo, J., García-Linares, M.C., Bastida, S., García-Arias, M.T., Sánchez-Muniz, F.J., 2003. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci. Technol. Int.* 9, 329–338.
- Young, S.A., Hung, S.C., Anderson, W.H., Albers, D.R., Langhorst, M.L., Yokoyama, W., 2012. Effects of cationic hydroxyethyl cellulose on glucose metabolism and obesity in a diet-induced obesity mouse model. *J. Diab.* 4, 85–94.

## 5.6. PUBLICACIÓN N°6

**Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics** 2012;5:158–167.

**Efectos de reestructurados cárnicos, conteniendo *Himanthalia elongata*, sobre la expresión génica de enzimas lipogénicos y lipolíticos del tejido adiposo de ratas normo- y hipercolesterolémicas**

Laura González-Torres; Itziar Churrua; Adriana R. Schultz Moreira; Sara Bastida; Juana Benedí; María P. Portillo; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Antecedentes: La inclusión de algas marinas en reestructurados de carne de cerdo (RC) mejoraría las propiedades saludables de dicha carne. Objetivo: El objetivo fue determinar los efectos del RC conteniendo *Himanthalia elongata* sobre crecimiento, peso de órganos, colesterolemia, y expresión génica de las enzimas lipoproteína lipasa (LPL), acetil CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), lipasa sensible a hormonas (HSL) en el tejido adiposo de ratas Wistar. Métodos: El grupo control (C) consumió RC control, y el grupo de algas (SS) RC con 5% *Himanthalia elongata*. Los animales con las dietas enriquecidas en colesterol (ColC, ColSS) consumieron sus dietas basales respectivas adicionadas de colesterol (2.43%) más ácido cólico (0.49%), como agentes hipercolesterolémicos. Resultados: La inclusión de algas no modificó la colesterolemia en las ratas que no ingirieron colesterol, pero redujo ( $p<0,01$ ) el efecto hipercolesterolemizante del colesterol más el ácido cólico de la dieta. Las ratas ColC presentaron menor grasa adiposa ( $p<0,05$ ) y peso que las ratas C. El colesterol añadido afectó la expresión génica de HSL, ACC, y FAS ( $p<0,05$ ), mientras que el consumo de algas influyó la expresión génica de HSL y ACC ( $p<0,05$ ). La expresión de LPL no se vio afectada significativamente por ambos factores. En comparación con las ratas ColC, las ratas ColSS mostraron una disminución de la expresión génica de la HSL y FAS ( $p<0,05$ ), pero un incremento de ACC ( $p<0,05$ ). Conclusión: El RC con *Himanthalia elongata* bloqueó parcialmente el efecto hipercolesterolemizante de la dieta y cambió la expresión génica de las enzimas lipogénicas / lipolíticas, reduciendo el efecto hipercolesterolemizante en el tejido adiposo en ratas.

## Original Paper

# Effects of Restructured Pork Containing *Himanthalia elongata* on Adipose Tissue Lipogenic and Lipolytic Enzyme Expression of Normo- and Hypercholesterolemic Rats

Laura González-Torres<sup>a</sup> Itziar Churrua<sup>c</sup>  
 Adriana R. Schultz Moreira<sup>a</sup> Sara Bastida<sup>a</sup> Juana Benedí<sup>b</sup>  
 María P. Portillo<sup>c</sup> Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) and <sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, and

<sup>c</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Vitoria, Spain

## Key Words

Adipose tissue • Dietary cholesterol • Functional meat • Gene expression • Plasma cholesterol • Sea spaghetti seaweed

## Abstract

**Background:** Inclusion of seaweeds in restructured pork (RP) would improve meat health properties. **Aim:** The aim was to determine the effects of RP containing *Himanthalia elongata* on growth, organ weight, cholesterolemia, and expression of lipoprotein lipase (LPL), acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), and hormone-sensitive lipase (HSL) in adipose tissue of Wistar rats. **Methods:** The control group (C) consumed control RP, and the seaweed group (SS) consumed RP with 5% *Himanthalia elongata*. Animals on cholesterol-enriched diets (CholC, CholSS) consumed their corresponding basal diets with supplementary cholesterol (2.43%) plus cholic acid (0.49%) as hypercholesterolemic agents. **Results:** Seaweed inclusion did not modify cholesterolemia but reduced ( $p < 0.01$ ) the hypercholesterolemic effect of dietary cholesterol plus cholic acid. CholC rats presented lower ( $p < 0.05$ ) adipose fat and weight than C rats. Cholesterol feeding affected HSL, ACC, and FAS expression ( $p < 0.05$ ), while alga consumption influenced HSL and ACC ( $p < 0.05$ ). LPL was not significantly affected by both factors. CholSS rats



showed decreased HSL and FAS ( $p < 0.05$ ) but increased ACC ( $p < 0.05$ ) expression compared with CholC rats. **Conclusion:** *Himanthalia* RP partially blocked the dietary hypercholesterolemic effect and changed the lipogenic/lipolytic enzyme expression, reducing the wasting effect of hypercholesterolemia on adipose tissue in rats.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Central adiposity is related to an increased risk of chronic disease [1, 2]. The prevalence of obesity is increasing worldwide, affecting people in both developed and developing countries [3, 4] and reaching alarming proportions in children and adolescents [5].

Epidemiological associations between the consumption of meat and meat derivatives and some of the major degenerative diseases such as coronary heart disease, cancer, high blood pressure, and obesity have been made [6], although no clear differentiations are made between different meat types. Pork is the most consumed meat type in Spain [7] and other Mediterranean countries such as France and Italy [8], although general concern exists due to its high fat and saturated fatty acid content. For this reason, the meat industry is introducing qualitative and/or quantitative modifications in meat and/or meat derivatives to create ‘functional’ products [9, 10]. As meat is a daily consumed food for a large proportion of people, it can be easily reformulated [6, 9, 10]; thus, it appears to be a good vector for including food or bioactive ingredients assuring their adequate daily consumption [11].

Physiologically active substances, many of which are from vegetable origin, can be combined with meat derivatives to produce potentially healthier meat products. The consumption of marine algae, which are traditional components of the Asian diet, has increased considerably in the Western world over the last decade [12]. Due to their low fat content, algae contribute few calories to the diet but supply a large amount of minerals, polyphenols, and fibers [12, 13]. Moreover, as human intestinal enzymes cannot completely digest algal carbohydrates and proteins, their energy bioavailability is low [13, 14]. Although a great deal of information regarding nori and kombu algae has already been published, little scientific data is available to date on sea spaghetti seaweed (*Himanthalia elongata*). Oben et al. [15] have studied the effects of a fresh-water alga on cardiovascular disease risk factors in overweight and obese individuals with metabolic syndrome in a randomized double-blind placebo-controlled study. A group given 1 fluid ounce/day of ProAlgaZyme oral infusion for 10 weeks lost significantly more body weight and body fat than a group given a water placebo.

The influence of sea spaghetti on adipocyte metabolism in normo- and hypercholesterolemic rats has not been tested yet. We hypothesized that consumption of restructured pork (RP) containing sea spaghetti may modify adipocyte metabolism in rats given cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched diets, decreasing adipose tissue mass and lipid content by altering lipogenic and lipolytic enzyme gene expressions.

Taking into account previous findings, the aim of the present study was to explore how consumption of a diet including RP containing sea spaghetti affects plasma and white adipose tissue cholesterol values as well as the expression of lipoprotein lipase (LPL), acetyl CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), and hormone-sensitive lipase (HSL) in white adipocytes of growing rats. These effects were tested within the framework of cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched diets.

## Materials and Methods

### Restructured Meat Preparation

Meat raw materials (post-rigor pork and pork back fat), sea spaghetti seaweed (*Himanthalia elongata*), and additives (sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium nitrite) were used. Fresh marine seaweed, collected on the Atlantic coast of Spain, dried in the shade, and packed in polyethylene plastic bags for commercial distribution, was acquired for the study (Algamar C.B., Redondela, Spain). The seaweed was milled (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch GmbH and Co. KG, Haan, Germany), passed through a 0.25-mm mesh sieve, and stored in plastic flasks at  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  until used. Details of the RP preparation and composition have been published previously [9]. In short, meat raw materials were homogenized and grounded for 1 min in a chilled cutter ( $2^\circ\text{C}$ ) (Stephan Universal Machine UM5, Stephan & Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany). All the fat, half of the seaweed, NaCl (2.0% for control samples and 0.5% for samples with added seaweed), sodium tripolyphosphate, and sodium nitrite were added to the grounded meat, and all compounds were mixed for 1 min; then the rest of the ingredients and the mixture were homogenized for 1 min. In the whole process, the seaweed was added to a final concentration of 15%. Finally, the whole meat batter was homogenized under vacuum for 2 min. Each meat sample was prepared in duplicate. Meat samples were freeze-dried for 48 h in a LyoAlfa 10 freeze dryer (Teltar, Terrassa, Spain). Samples were frozen to  $-30^\circ\text{C}$  and submitted to vacuum at 0.03 mb. The working temperature was increased up to  $20^\circ\text{C}$ .

### Diet Preparation and Experimental Design

Forty male growing Wistar rats with a body weight of approximately 90 g at the start were obtained from Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cages in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.8^\circ\text{C}$ ) with a 12-hour light-dark cycle. All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986, for the protection of scientific research animals. After weaning, rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) during a 1-week period of adaptation to the environmental conditions and then divided into four groups of 10 animals each, according to average body weight. Water and food were provided ad libitum over the 5-week experimental period.

Four experimental semi-synthetic diets were formulated: (a) the control diet without added cholesterol (C) contained a homogenous mixture of 85% rodent diet (AIN-93M No. 180729 purified rodent diet; DYETS, Inc., Bethlehem, Pa., USA) and 15% RP (with 4% microcrystalline cellulose); (b) the sea spaghetti diet (SS) consisted of a mixture of AIN-93M feed (85%) and freeze-dried restructured meat containing 15% sea spaghetti; (c) the cholesterol control diet (CholC) (AIN-93M No. 180730 diet) was identical to the C diet but with 2.43% cholesterol (95–98% purity) and 0.49% cholic acid (>98% purity) substituting an equal amount of starch, and (d) the cholesterol sea spaghetti (CholSS) diet consisted of the sea spaghetti diet enriched with cholesterol and cholic acid. All experimental diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 4.2% total dietary fibers. To obtain experimental diets, AIN-93M No. 180729 or AIN-93M No. 180730 diet compounds were carefully mixed with the corresponding powered freeze-dried meat, passing the resulting mix three times through a sieve. The detailed composition of the diets tested is summarized in table 1 and has been published elsewhere [16].

### Food Intake and Dietary Efficiency Ratio

Food intake was checked daily, and body weight variations were measured on alternate days. The dietary efficiency ratio (DER) was calculated as the ratio between body weight gain and total intake. At the end of the 5-week experimental period, and under overnight fasting conditions, animals of each of the four groups were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and euthanized by extracting blood from the descending aorta with a syringe. Blood was collected in tubes with heparin to prevent clotting.

### Fat Adipose Tissue Extraction

The adipose tissue fat content was determined by gravimetry after lipid extraction according to the method described by Folch et al. [17].



**Table 1.** Composition of the different diets used in this study<sup>1</sup>

	C	SS	CholC	CholSS
Diet AIN-93M				
Maize starch, g/kg diet	382.75	382.75	353.59	353.59
Cholesterol, g/kg diet			24.31	24.31
Cholic acid, g/kg diet			4.85	4.85
Pork (freeze-dried) <sup>2</sup>				
Control RP, g/kg diet <sup>2</sup>	150		150	
Sea spaghetti RP, g/kg diet <sup>2</sup>		150		150
SFA, % total fatty acids in pork	36.72	37.61	36.72	37.61
MUFA, % total fatty acids <sup>3</sup>	52.62	50.02	52.62	50.02
PUFA, % total fatty acids <sup>3</sup>	10.66	12.37	10.66	12.37
Polyphenols (as gallic acid equivalent, mg/100 g) <sup>3</sup>	Trace	2,570	Trace	2,570
Iron, mg/100 g wet matter	0.855	0.698	0.855	0.698
Sodium, mg/100 g wet matter	873.8	565.9	873.8	565.9
Soluble fibers, g/100 g wet matter <sup>3</sup>		1.35		1.35
Insoluble fibers, g/100 g wet matter <sup>3</sup>	2.81	1.46	2.81	1.46

<sup>1</sup> Other ingredients (in g/kg diet): casein 127.5; soybean oil 34; dxytrose (carbohydrate composition: monosaccharides 10; disaccharides 40; trisaccharides 50; tetrasaccharides and higher 900) 131.75; sucrose 85; microcrystalline cellulose 42.50; AIN-93M mineral mix 29.75; AIN-93VX vitamin mixture 12.16; choline bitartrate 3.06; l-cystine 1.53; t-butylhydroquinone 0.0068.

AIN-93M mineral mix (in g/kg): calcium carbonate 357.00; potassium phosphate monobasic 250.00; potassium citrate H<sub>2</sub>O 28.00; sodium chloride 74.00; potassium sulfate 46.60; magnesium oxide 24.00; ferric citrate U.S.P. 6.06; zinc carbonate 1.65; manganese carbonate 0.63; cupric carbonate 0.30; potassium iodate 0.01; sodium selenate 0.01025; ammonium paramolybdate-4H<sub>2</sub>O 0.00795; sodium metasilicate 9H<sub>2</sub>O 1.45; chromium potassium sulfate-12H<sub>2</sub>O 0.275; lithium chloride 0.0174; boric acid 0.0815; sodium fluoride 0.0635; nickel carbonate 0.0318; ammonium vanadate 0.0066; finely powdered sucrose 209.806.

AIN-93VX vitamin mixture (in g/kg): niacin 3.00; calcium pantothenate 1.60; pyridoxine HCl 0.70; thiamine HCl 0.60; riboflavin 0.60; folic acid 0.20; biotin 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g) 15.00; vitamin B12 (0.1%) 2.50; vitamin A palmitate (150,000 µg/g) 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10,000 µg/g) 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g) 7.50; sucrose 967.23.

<sup>2</sup> Control pork (150 g): 75.22 g protein, 48.99 g fat, 15.79 g minerals (ash), and 10 g fibers (microcrystalline cellulose); sea spaghetti freeze-dried RP: 69.56 g protein, 51.25 g fat, 15.05 g minerals (ash), and 14.12 g fibers.

<sup>3</sup> Data from López-López et al. [9] and Cofrades et al. [40].

#### Plasma Cholesterol Determination

Plasma was obtained after blood centrifugation at 2,500 g at 4°C for 20 min. Plasma cholesterol was tested using a standard enzymatic colorimetric method (Spinreact, S.A., Girona, Spain).

#### Extraction and Analysis of RNA and Quantification by RT-PCR

Total RNA was isolated from 100 mg of a homogeneous mix of perirenal and periepididymal adipose tissue using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then treated with the DNA-free™ Kit, DNase Treatment, and Removal Reagents, (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by measuring absorbance at 260, 270, 280, and 310 nm and by electrophoresis on 1.3% agarose gels. 1.5 µg of total RNA of each sample was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA).

Relative FAS, ACC, HSL, and LPL mRNA levels were quantified using real-time PCR with an iCycler™ – MyiQ™ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad), and a TaqMan probe for FAS and SYBR® Green for ACC, HSL, and LPL. β-Actin mRNA levels were similarly measured and served as the reference gene.

In the case of FAS and  $\beta$ -actin, 1  $\mu$ l of each cDNA was added to the PCR reagent mixture, Premix Ex Taq™ (Takara, Madison, Wisc., USA), with the upstream (200 nM FAS and 200 nM  $\beta$ -actin) and downstream primers (300 nM FAS and 200 nM  $\beta$ -actin) as well as the probe (2.5  $\mu$ M FAS and 0.5  $\mu$ M  $\beta$ -actin). Specific primers were designed (GeneBank: FAS, NM-007988;  $\beta$ -actin, AJ312092) and synthesized commercially (Eurogentec, Liège, Belgium), and their sequences were: FAS sense: 5'-CAGCGTATCACCTCTTGCATGG-3'; FAS antisense: 5'-CCTGCTAGGTCCCGGATACC-3'; 5'-FAM-TGCCACGGCCTT CACCAGATCCCT-BHQ-3' (probe);  $\beta$ -actin sense: 5'-TCTATGAGGGCTACGCTCTCC-3';  $\beta$ -actin antisense: 5'-CACGCTCGGTCA-GGATCTTC-3'; 5'-FAM-CCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC-BHQ-3' (probe).

The PCR parameters were as follows: denaturation at 95°C for 5 s followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 5 s and combined annealing and extension at 60°C for 60 s for FAS and 30 s for  $\beta$ -actin.

In the case of ACC, HSL, and LPL mRNA levels,  $\beta$ -actin mRNA levels were also measured with SYBR® Green Master Mix to normalize the results. 0.1  $\mu$ l of each cDNA were added to the PCR reagent mixture, SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), with the upstream and downstream primers (600 nM each for ACC, 300 nM each for HSL and  $\beta$ -actin, and 900 nM forward primers and 600 nM reverse primers for LPL). Specific primers (GenBank: HSL, NM 010719; LPL, AF356087; ACC, AF356089;  $\beta$ -actin AJ312092) were synthesized commercially (Tib Molbiol, Berlin, Germany), and the sequences were: HSL sense: 5'-GGTGACACTCGCAGAAGACAATA-3'; HSL antisense: 5'-GCCGCCGTGCTGTCTCT-3'; LPL sense: 5'-CAGCTGGGCCTAACTTTGAG-3'; LPL antisense: 5'-CCTCTCTGCAATCACACGAA-3'; ACC sense: 5'-GGACCACTGCATGGAATGTAA-3'; ACC antisense: 5'-TGAGTGACTGCCGAAACATCTC-3';  $\beta$ -actin sense: 5'-ACGAGGCCAGAGCAAGAG-3';  $\beta$ -actin antisense: 5'-GGTGTGGT-GCCAGATCTTCTC-3'.

The PCR parameters were as follows: initially 2 min at 50°C, denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 62.7°C for ACC, 60°C for HSL and  $\beta$ -actin, and at 60.4°C for LPL for 30 s, and extension at 60°C for 30 s. Levels of all mRNA samples were normalized to their  $\beta$ -actin values, and the results expressed as fold changes of the threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [18].

#### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 15.0 statistical analysis package (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Results were expressed as mean values and standard deviations. Two-way ANOVA (cholesterol and seaweed) was performed to analyze the effects of each factor. The alga and cholesterol effects were studied separately using unpaired Student's t test for the C versus SS, C versus CholC, and SS versus CholSS group comparisons. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

Body weight gain and cumulative intakes were significantly affected ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively) by the cholesterol-alga interaction (table 2). Dietary inclusion of seaweed significantly affected body weight ( $p < 0.05$ ), while that of cholesterol influenced the cumulative food intake ( $p < 0.001$ ). The S diet induced lower body weight gain than the C diet ( $p < 0.001$ ). The C and S groups ate less than their CholC and CholSS counterparts ( $p < 0.05$ ). SS group animals ate less than C rats ( $p < 0.05$ ), while CholSS animals consumed more than the control animals ( $p < 0.001$ ). The DER was significantly affected by inclusion of alga ( $p < 0.001$ ) and cholesterol ( $p < 0.001$ ) in the diet. The SS diet showed a lower DER than the C diet. CholC and CholSS animals presented a lower DER than their C and S counterparts ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) (table 2).

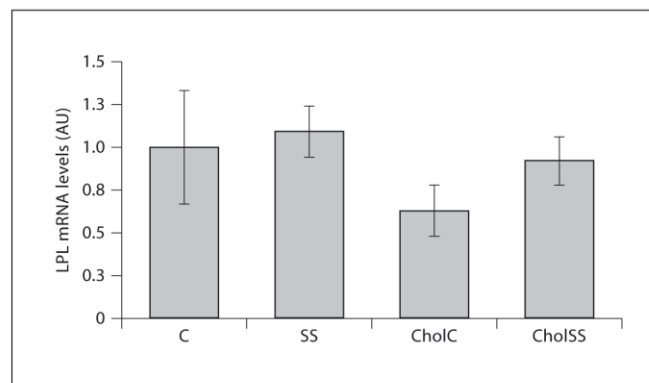
Table 2 also shows the perirenal plus periepididymal adipose tissue weight and fat contents of the four rat groups. Dietary cholesterol significantly affected adipose tissue weight ( $p < 0.001$ ). CholC rats presented a lower adipocyte mass than C rats ( $p < 0.01$ ). The fat content was significantly affected by the alga-cholesterol interaction ( $p = 0.030$ ) and by dietary cholesterol ( $p < 0.001$ ). C rats had more adipose fat than CholC rats ( $p < 0.01$ ). Plasma cholesterol was significantly affected by the cholesterol-alga interaction ( $p < 0.001$ ), and the pres-

**Table 2.** Effect of a cholesterol-enriched diet containing control or sea spaghetti seaweed RP on cumulative intake, body weight gain, adipose tissue weight, adipocyte fat, and plasma total cholesterol of Wistar rats (n = 10)

	C	SS	CholC	CholSS	ANOVA		
					interaction	alga	cholesterol
Cumulative intake, g	649.0 ± 44.6	603.6 ± 38.7*	721.0 ± 41.5 <sup>a</sup>	776.7 ± 31.7**, <sup>a</sup>	<0.001	0.679	<0.001
Weight gain, g	192.0 ± 16.0	163.7 ± 15.8***	178.6 ± 26.3	177.9 ± 23.4	0.042	0.033	0.955
Dietary efficiency ratio <sup>1</sup>	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.02*	0.25 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.721	0.016	<0.001
Adipose tissue weight <sup>2</sup> , g	10.7 ± 3.1	9.1 ± 3.4	5.5 ± 3.9 <sup>b</sup>	7.4 ± 2.1	0.089	0.921	0.001
Adipocyte fat, g/g tissue	0.85 ± 0.07	0.78 ± 0.06*	0.51 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.17	0.030	0.343	0.001
Adiposomatic index <sup>3</sup>	3.45 ± 1.02	3.18 ± 1.13	1.62 ± 1.20 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.74	0.104	0.419	<0.001
Plasma total cholesterol, mg/dl	59.5 ± 19.4	60.7 ± 6.5	236.9 ± 57.9 <sup>a</sup>	120.7 ± 41.3*, <sup>b</sup>	<0.001	<0.001	<0.001

Data are mean ± SD.

<sup>1</sup> Body weight increase (g)/food intake (g). <sup>2</sup> Perirenal plus periepididymal adipose tissues. <sup>3</sup> 100 × adipose tissue weight/body weight. \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01; \* p < 0.05, SS versus C or CholSS versus CholC rats; <sup>a</sup> p < 0.001; <sup>b</sup> p < 0.01; <sup>c</sup> p < 0.05, CholC versus C or CholSS versus SS rats.

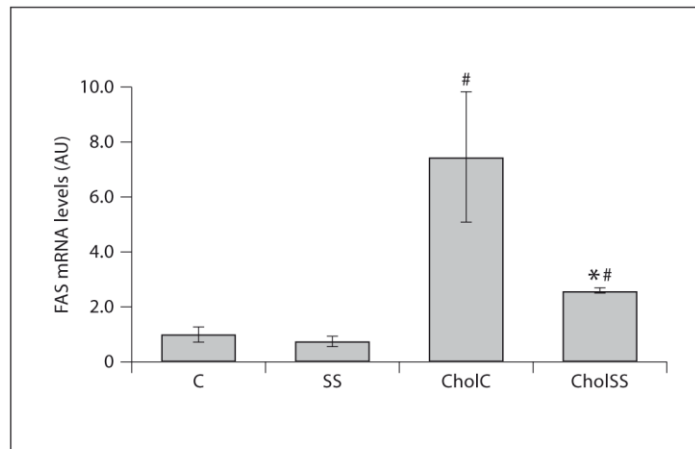
**Fig. 1.** Effect of a cholesterol-enriched diet containing control or sea spaghetti restructured meat on LPL expression of Wistar rat adipose tissue. Values are mean ± SD (n = 10). CholC and CholSS rats consumed C and SS basal diets enriched with cholesterol (2.43%) and cholic acid (0.49%). Cholesterol × alga interaction, p = 0.639; cholesterol effect, p = 0.240; alga effect, p = 0.445.

ence of alga (p < 0.001) and cholesterol (p < 0.001) (table 2). CholC rats showed significantly higher plasma cholesterol levels than their C (p < 0.001) and CholSS (p < 0.05) counterparts. CholSS rats presented higher plasma cholesterol than SS rats (p < 0.01) (table 2).

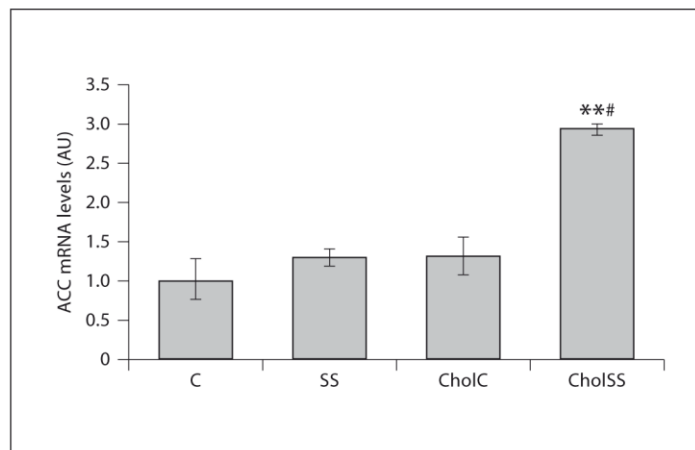
Figure 1 shows mRNA levels of LPL. Data were not significantly (p > 0.05) affected by either the cholesterol-alga interaction or by the consumption of dietary cholesterol or alga. Figure 2 presents the differences in FAS expression between the groups. Supplementary dietary cholesterol increased FAS expression (p = 0.003). Nonsignificant effects (p > 0.05) on FAS expression of the interaction cholesterol-alga were observed. CholC (p < 0.05) and CholSS (p < 0.05) rats displayed higher FAS mRNA levels than their C and SS counterparts, respectively. FAS expression in C rats was lower than that in CholC rats (p < 0.05). Figure 3 presents the ACC mRNA results. Cholesterol significantly (p < 0.001) affected ACC expression. CholSS rats expressed significantly more ACC than SS (p < 0.05) and CholC (p < 0.01) animals. Figure 4 shows the differences in HSL mRNA values between the groups. Inclusion of cholesterol (p = 0.012) and alga (p = 0.008) in the diet increased expression of HSL mRNA. SS and CholSS rats expressed less HSL than their C and CholC counterparts, respectively (both p < 0.05). CholSS animals expressed more HSL than SS animals (both p < 0.05).



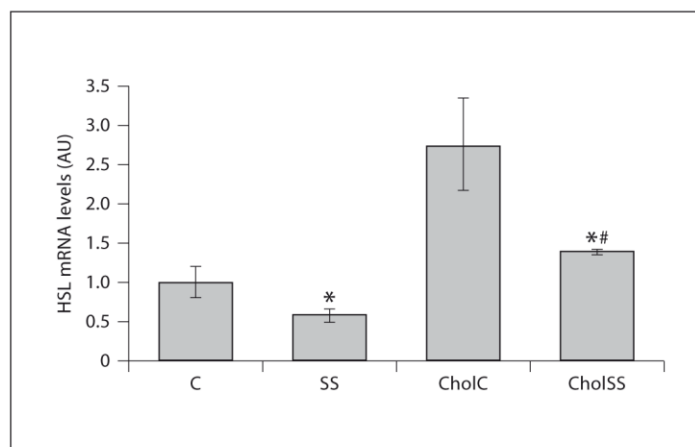
**Fig. 2.** Effect of a cholesterol-enriched diet containing control or sea spaghetti restructured meat on FAS expression of Wistar rat adipose tissue. Values are mean  $\pm$  SD (n = 10). CholC and CholSS rats consumed C and SS basal diets enriched with cholesterol (2.43%) and cholic acid (0.49%). Cholesterol  $\times$  alga interaction,  $p = 0.220$ ; cholesterol effect,  $p = 0.003$ ; alga effect,  $p = 0.021$ ; #  $p < 0.001$ , CholC versus C and CholSS versus SS; \*  $p < 0.05$ , CholSS versus CholC.



**Fig. 3.** Effect of a cholesterol-enriched diet containing control or sea spaghetti restructured meat on ACC expression of Wistar rat adipose tissue. Values are mean  $\pm$  SD (n = 10). CholC and CholSS rats consumed C and SS basal diets enriched with cholesterol (2.43%) and cholic acid (0.49%). Cholesterol  $\times$  alga interaction,  $p = 0.549$ ; cholesterol effect,  $p \leq 0.001$ ; alga effect,  $p = 0.191$ ; #  $p < 0.05$ , CholSS versus SS; \*\*  $p < 0.01$ , CholSS versus CholC.



**Fig. 4.** Effect of a cholesterol-enriched diet containing control or sea spaghetti restructured meat on HSL expression of Wistar rat adipose tissue. Values are mean  $\pm$  SD (n = 10). CholC and CholSS rats consumed C and SS basal diets enriched with cholesterol (2.43%) and cholic acid (0.49%). Cholesterol  $\times$  alga interaction,  $p = 0.787$ ; cholesterol effect,  $p = 0.012$ ; alga effect,  $p = 0.008$ ; #  $p < 0.05$ , CholSS versus SS; \*  $p < 0.05$ , SS versus C and CholSS versus CholC.



## Discussion

The present results show, for the first time, that inclusion of sea spaghetti-enriched RP decreased the highly lipolytic effect of feeding cholesterol affecting the expression of lipogenic/lipolytic adipocyte enzymes.

These data suggest that the SS diet was consumed at a smaller ratio than the C diet, which cannot be attributable to different energy diet contents as diets have similar energy contents (3,962–3,965 kcal/kg for non-added cholesterol diets and 3,846–3,965 kcal/kg for added cholesterol diets). Sea spaghetti contains high levels of soluble fibers [19] which partially explains our results due to the theoretical filling role of soluble/viscose fibers as several human and animal studies have demonstrated that soluble fiber consumption is associated with altered circulating levels of the anorexigen hormone peptide YY [20] and leptin [21].

Similar data were found by including nori in meat diets [16]. The SS diet resulted in a smaller weight gain than the C diet. Among alga compounds, fucoxanthin, a carotenoid including an unusual allenic bond and 5,6-monoepoxide in its molecule, has been shown to decrease body weight and abdominal white adipose tissue weight in mice [22]. Oben et al. [15] found that 1 fluid ounce/day of ProAlgaZyme oral infusion for 10 weeks induced significant body weight and body fat losses. Cholesterol feeding decreased DER. Nonetheless, the filling effect of alga fibers was lost when cholesterol was added to the SS diet. In agreement with Beynen et al. [23], supplementary dietary cholesterol decreased the growth rate. Lower body weight gain in rabbits but not in rats fed cholesterol-enriched diets has been found [24].

Inclusion of cholesterol in the diet increases plasma cholesterol [25–27]. Sea spaghetti RP partially blocked the effect of the hypercholesterolemic agent included in the CholSS diet. Sea spaghetti is rich in soluble fibers [19] and polyphenols [10, 28], all of which are factors that are thought to exert hypocholesterolemic effects. Sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan have been shown to interact with dietary cholesterol to facilitate its excretion, while dietary agar was almost inactive [29].

LPL activity increases with obesity, but also paradoxically following weight loss and as a response to refeeding [30], suggesting that LPL regulated the set point in the adipocyte. Our results indicate that consumption of sea spaghetti RP did not modify LPL expression in rats given cholesterol-enriched or non-cholesterol-enriched diets. LPL expression in CholC animals was reduced by about 25%, although not significantly ( $p > 0.05$ ), with respect to the other diets. These results could be attributable to the lowest adipose tissue weight and adiposomatic index of this rat group.

HSL mRNA significantly decreased with the intake of the SS diet compared with the C diet. At present, we do not have a clear explanation for these results taking into account the activating lipolytic actions of phlorotannins [31–33]. Lasa et al. [34] found that resveratrol increased fatty acid release in epididymal adipose tissue of wild-type and HSL knockout mice. The decrease of HSL expression in SS versus C rats seems a probable counterbalance mechanism to avoid excessive losses of body weight and adipose tissue weight and fat in SS animals. In fact, when the LPL/HSL expression ratio is used as a adipogenetic/adipolytic ratio, C rats had a relative LPL/HSL ratio of 1, while SS rats had a ratio of 1.8; however, this hypothesis should be tested in future works. Dietary cholesterol appears to increase adipocyte lipolysis, as suggested by the higher levels of HSL mRNA (three times higher) and the decrease in body fat (by about 50%) and fat content of the adipose tissue (by 40%) observed in CholC rats compared with C rats. The effect of dietary cholesterol on CholC rat adipocyte HSL expression is probably linked to the regulation of plasma cholesterol as HSL expression is significantly related to cholesterolemia ( $r = 0.416$ ;  $p < 0.05$ ).

Cholesterol esterification with fatty acids in the liver has been proposed as an important mechanism for controlling cholesterolemia [35, 36]. It is well known that large mobilization

of FFA from adipose tissue to the liver takes place, mostly during the interprandial stage [37]. This mechanism would contribute to an improved liver cholesterol esterification. The decrease of HSL expression in CholSS versus CholC rats could be a consequence of the lower demand of FFA for liver cholesterol esterification, which in turn reduces the excessive losses of body weight and adipose tissue weight and fat in SS animals. CholC and CholSS rats presented a relative LPL/HSL ratio of 0.24 and 0.63, respectively.

Consumption of the SS diet did not modify the expression of ACC and FAS despite the food intake, weight gain, and adipose tissue fat decreases observed. The CholC diet increased the adipose tissue expression of FAS but not that of ACC, while the CholSS diet increased the adipose tissue expression of ACC but not that of FAS. The ACC enzyme is a limiting enzyme participating in the first step of fatty acid synthesis, giving rise to malonyl-CoA, while FAS transforms malonyl-CoA in palmityl-CoA [38]. The excess in de novo fatty acid synthesis decreases ACC expression [38]. It can be speculated that both CholC and CholSS rats tended to increase the adipose fatty acid bioavailability but through different mechanisms (ACC or FAS expression). As previously suggested in this paper, FAS expression appears to be increased to avoid excessive adipose tissue fat depletion in cholesterol-fed rats; thus, a decrease in FAS due to alga consumption in CholSS rats must be counterbalanced by an increase in ACC expression. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids have been shown to reduce gene expression of FAS in adipose tissue [39]. It thus appears likely that these fatty acids affected FAS expression to some degree as n-3 fatty acids constitute 20–50% of the alga total fatty acid content [10].

In conclusion, the body weight-reducing effect that is generally associated with seaweed consumption was observed in rats consuming the SS diet, where the adipocyte HSL expression was decreased. Moreover, intake of this alga in the framework of a cholesterol-enriched diet reduced plasma cholesterol levels. Some alga compounds affect the ACC or FAS expression modulated by cholesterol feeding. More studies are needed to explain the mechanism of alga compounds in the adipose tissue of cholesterol-fed animals.

### Acknowledgements

Study supported by the Spanish projects AGL-2011-29644-C02-02, Consolider-Ingenio 2010 No. CSD2007-00016 Basque Country University (UFI 11/32) and Basque Country Government (IT-386-10). We acknowledge the fellowship awarded to Adriana Schultz by the Universidad Complutense, Madrid, Spain, and the fellowship granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico to Laura González.

### References

- ▶1 Kopelman P: Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635–643.
- ▶2 McKeigue P, Shah B, Marmot M: Relation of central obesity and insulin resistance with high diabetes prevalence and cardiovascular risk in South Asians. *Lancet* 1991;337:382–386.
- ▶3 Carr M, Brunzell J: Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2601–2607.
- ▶4 Kelishadi R: Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiol Rev* 2007;29:62–76.
- 5 Wang Y, Lobstein T: Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 2001;6:11–25.
- ▶6 Jiménez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S: Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Sci* 2001;9:5–13.
- 7 Spanish National Nutrition Survey (Encuesta Española de encuesta dietética), 2011. [http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/Presentacion\\_ENIDE.pdf](http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentacion_ENIDE.pdf).
- 8 <http://www.census.gov/compendia/statab/2012/tables/12s1377.pdf>.
- ▶9 López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz F, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F: Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* 2009;83:492–498.



- ▶ 10 Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ: Characteristics and nutritional and cardiovascular health properties of seaweeds. *J Med Food* 2009;12:236–258.
- 11 Sánchez-Muniz, FJ, Canales A, Nus M, Bastida S, Guillén M, Corella D, Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Benedi J: The antioxidant status response to low-fat and walnut paste-enriched meat differs in volunteers at high cardiovascular risk carrying different PON-1 polymorphisms. *J Am Coll Nutr* DOI: [Xinet/production/jacn/live\\_jobs/jacn-31-03-03/layouts/jacn-31-03-03](https://doi.org/10.1080/10444065.2012.701111).
- ▶ 12 Bocanegra A, Benedi J, Sánchez-Muniz FJ: Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 2006;95:696–702.
- ▶ 13 Christine Bobin-Dubigeon C, Lahaye M, Guillon F, Barry JL, Gallant D: Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp. cell-wall polysaccharides. *J Sci Food Agric* 1997;75:341–351.
- ▶ 14 von Engelhardt W, Bartels J, Kirschberger S, Meyer zu Düttingdorf HD, Busche R: Role of short-chain fatty acids in the hind gut. *Vet Q* 1998;20(suppl 3):S52–S59.
- ▶ 15 Oben J, Enonchong E, Kuete D, Mbanya D, Thomas TC, Hildreth DJ, Ingolia DT, Tempesta MS: The effects of Pro AlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids Health Dis* 2007;6:20–29.
- ▶ 16 Moreira AS, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedi J, Sánchez-Muniz FJ: Wakame and Nori in re-structured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:290–298.
- ▶ 17 Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- ▶ 18 Livak K, Schmittgen T: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001;25:402–408.
- ▶ 19 Gómez-Ordóñez, E, Jimenez-Escrig A, Ruperez P: Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res Int* 2010;43:2289–2294.
- ▶ 20 Beck EJ, Tapsell LC, Batterham MJ, Tosh SM, Huang XF: Oat beta-glucan supplementation does not enhance the effectiveness of an energy-restricted diet in overweight women. *Br J Nutr* 2010;103:1212–1222.
- ▶ 21 Young SA, Hung SC, Anderson WH, Albers DR, Langhorst ML, Yokoyama W: Effects of cationic hydroxyethyl cellulose on glucose metabolism and obesity in a diet-induced obesity mouse model. *J Diabetes* 2012;4:85–94.
- ▶ 22 Maeda H, Tsukui T, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K: Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17(suppl 1):196–199.
- ▶ 23 Beynen AC, Boogaard A, Van Laack HL, Katan MB: Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr* 1984;114:1640–1651.
- ▶ 24 Mahfouz MM, Kummerow FA: Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 2000;11:293–302.
- ▶ 25 Sánchez-Muniz FJ, Higón E, Cava F, Viejo JM: Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J Agric Food Chem* 1992;40:2226–2231.
- ▶ 26 Sánchez-Muniz FJ, Cava F, Viejo JM, Bastida S, Higón E, Marcos A: Olive oil-fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell-damage marker enzymes. *Nutr Res* 1996;16:111–121.
- ▶ 27 Sánchez-Muniz FJ, Bastida S: Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008;110:295–301.
- ▶ 28 Dawczynski C, Schäfer U, Leiterer M, Jahreis G: Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products. *J Agric Food Chem* 2007;55:10470–10475.
- ▶ 29 Jimenez-Escrig A, Sanchez-Muniz FJ: Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 2000;20:585–598.
- 30 Kern PA: High adipose tissue lipoprotein lipase activity plays a causal role in the aetiology of obesity; in Angel A (ed): *Progress in Obesity Research*. London, J Libbey, 1996, pp 25–50.
- ▶ 31 Jormalainen V, Honkanen T: Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J Evol Biol* 2004;17:807–820.
- ▶ 32 Ragan MA, Glombitza KW: Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog Phycol Res* 1986;4:129–241.
- ▶ 33 Koivikko R, Eränen JK, Loponen J, Jormalainen V: Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *J Chem Ecol* 2008;34:57–64.
- ▶ 34 Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churrua I, Simón E, Zechner R, Portillo MP: Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem* 2012;23:379–384.
- ▶ 35 Daumerie CM, Woollett LA, Dietschy JM: Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10797–10801.
- ▶ 36 Fielding CJ: Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *FASEB J* 1992;6:3162–3168.
- ▶ 37 Connor WE, Lin DS, Colvis C: Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. *J Lipid Res* 1996;37:290–298.
- 38 Nelson DL, Cox MM: *Lehninger Principles of Biochemistry*, ed3. New York, Worth Publisher, 2000.
- ▶ 39 Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferré P: Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* 1997;38:1963–1972.
- ▶ 40 Cofrades S, López-López I, Solas MT, Bravo L, Jiménez-Colmenero F: Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci* 2008;79:767–776.

**5.7. PUBLICACIÓN N°7.**

**Nutrición Hospitalaria.** 2013;28(5) 1474-1481. **ISI Web. JCR. (2012).** Índice impacto: 1.305 (57 de 764 en Nutrition and Dietetics)

**El consumo de carne de cerdo reestructurada conteniendo Nori o, Espagueti de Mar, pero no el de Wakame, reduce los efectos hipercolesterolemiantes y proapoptóticos hepáticos inducidos por altas cantidades de colesterol en la dieta**

Adriana R. Schultz Moreira; Juana Benedí; Sara Bastida; Isabel Sánchez-Reus; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** La incorporación de algas, ricas en fibra y compuestos asociados, a reestructurados de carne de cerdo (R) resulta en derivados cárnicos potencialmente funcionales. En este trabajo se estudian los efectos antiapoptóticos e hipocolesterolemiantes de dietas en las que se incluyen agentes hipercolesterolemiantes y R enriquecidos en diferentes algas, Wakame (RW), Nori-R (RN) y Espagueti de Mar (RE). Durante una semana grupos de seis ratas cada uno recibieron una mezcla constituida por 85% de dieta AIN-93M para roedores suplementada con colesterol y ácido cólico, como agente hipercolesterolemiante, y 15% de RW, RN o RE. Estas dietas fueron comparadas con otras a las que se incorporó R control y a las que se añadió o no el agente hipercolesterolemiante. Después de 1 semana de tratamiento el incremento de marcadores de apoptosis hepática observado en el lote control con colesterol se redujo por el consumo de las dietas RE (DNA ciclo celular, caspasa-3, y citocromo c), RN (caspasa-3, y citocromo c) and RW (caspasa-3). Sólo las dietas con RN and RE bloquearon significativamente la inducción hipercolesterolemiantes de la dieta control enriquecida en colesterol. Teniendo en cuenta las diferencias observadas entre los lotes respecto a sus efectos hipocolesterolemicos y antiapoptóticos, debe evitarse cualquier generalización sobre el consumo de algas y en particular de carnes conteniendo. Dada la relevancia de los resultados, deben realizarse estudios futuros en animales de experimentación y humanos para prevenir o curar daño hepático.

Original / Alimentos funcionales

## Nori- and Sea spaghetti- but not Wakame-restructured pork decrease the hypercholesterolemic and liver proapoptotic short-term effects of high-dietary cholesterol consumption

 Adriana R. Schultz Moreira<sup>1</sup>, Juana Benedi<sup>2</sup>, Sara Bastida<sup>1</sup>, Isabel Sánchez-Reus<sup>3</sup> and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain. <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.

### Abstract

Restructured pork (RP) enriched in Seaweeds are potential functional foods. The antiapoptotic and hypocholesterolemic effects of consuming cholesterol enriched diets containing Wakame-RP (CW), Nori-RP (CN) and Sea Spaghetti (CS) were tested in a 1-wk study. Groups of six rats per group were fed a mix of 85% AIN-93M rodent-diet containing cholesterol and cholic acid as a cholesterol rising agent plus 15% RP containing alga. These diets were compared to control-RP diets enriched or not in cholesterol (CC and C, respectively). After 1-wk, cholesterol feeding significantly increased liver apoptosis markers which were significantly reduced by CS (cellular cycle DNA, caspase-3, and cytochrome c), CN (caspase-3 and cytochrome c) and CW (caspase-3) diets. CN and CS diets significantly blocked the cholesterolaemic rising effect observed in the CC group but no protective effect was observed in the CW group. Differences in seaweed composition added to RP appear responsible for blocking or not the proapoptotic and hypercholesterolemic effects of high cholesterol-RP consumption; thus, any generalization on seaweed effects or food containing seaweeds must be avoided. Although present results are worthy, future studies are demanded to ascertain the utility of consuming algal-RP as part of usual diets.

(Nutr Hosp. 2013;28:1474-1481)

DOI:10.3305/nh.2013.28.5.????

Key words: Alga. Apoptosis. Cholesterol. Functional foods. Liver damage. Restructured pork.

**Correspondence:** Francisco J. Sánchez-Muniz.  
 Departamento de Nutrición.  
 Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
 28040 Madrid, Spain.  
 E-mail: frasan@ucm.es

 Recibido: 31-V-2013.  
 Aceptado: 26-VI-2013.

### EL CONSUMO DE CARNE DE CERDO REESTRUCTURADA CONTENIENDO NORI O, ESPAGUETTI DE MAR, PERO NO EL DE WAKAME, REDUCE LOS EFECTOS HIPERCOLESTEROLEMIANTES Y PROAPOPTOTICOS HEPATICOS INDUCIDOS POR ALTAS CANTIDADES DE COLESTEROL EN LA DIETA

### Resumen

La incorporación de algas, ricas en fibra y compuestos asociados, a reestructurados de carne de cerdo (R) resulta en derivados cárnicos potencialmente funcionales. En este trabajo se estudian los efectos antiapoptóticos e hipocolesterolemiantes de dietas en las que se incluyen agentes hipocolesterolemiantes y R enriquecidos en diferentes algas, Wakame (RW), Nori-R (RN) y Espagueti de Mar (RE). Durante una semana grupos de seis ratas cada uno recibieron una mezcla constituida por 85% de dieta AIN-93M para roedores suplementada con colesterol y ácido cólico, como agente hipocolesterolemiantes, y 15% de RW, RN o RE. Estas dietas fueron comparadas con otras a las que se incorporó R control y a las que se añadió o no el agente hipocolesterolemiantes. Después de 1 semana de tratamiento el incremento de marcadores de apoptosis hepática observado en el lote control con colesterol se redujo por el consumo de las dietas RE (DNA ciclo celular, caspasa-3, y citocromo c), RN (caspasa-3, y citocromo c) and RW (caspasa-3). Sólo las dietas con RN and RE bloquearon significativamente la inducción hipocolesterolemiantes de la dieta control enriquecida en colesterol. Teniendo en cuenta las diferencias observadas entre los lotes respecto a sus efectos hipocolesterolemiantes y antiapoptóticos, debe evitarse cualquier generalización sobre el consumo de algas y en particular de carnes conteniendo algas. Aunque los resultados son relevantes, deben realizarse estudios futuros para determinar la utilidad del consumo de estos R enriquecidos en algas dentro de dietas habituales.

(Nutr Hosp. 2013;28:1474-1481)

DOI:10.3305/nh.2013.28.5.????

Palabras clave: Algas. Alimentos funcionales. Apoptosis. Carne de cerdo reestructurada. Colesterol. Daño hepático.

## Abbreviations

C: Control-group.  
CC: Cholesterol-control.  
CN: Cholesterol-Nori.  
CS: Cholesterol-Sea spaghetti.  
CW: Cholesterol-Wakame.  
PUFA: Polyunsaturated fatty acids.  
RP: Restructured pork.

## Introduction

Seaweeds have gained importance as healthy foodstuffs in Western countries.<sup>1</sup> High consumption of red meats has been related to increased incidence and prevalence of degenerative diseases.<sup>2,3</sup> Pork-based functional foods containing seaweeds is an opportunity to improve the "image" of the meat product as these marine vegetables would positively modify meat composition increasing omega-3 fatty acid,<sup>4</sup> fibre and associate bioactive ingredient contents<sup>5,6</sup> and, therefore, exert positive effects on cardiovascular disease risk factors.<sup>7,8</sup>

Cholesterol consumption has been found to produce hepatomegalia, liver-fat infiltration and to increase some liver damage markers.<sup>9,10</sup> The benefits of seaweed consumption on liver disease have been suggested; *Ecklonia cava*<sup>11</sup> and *Spirulina*<sup>12</sup> were found to be effective in preventing the development of hepatic fibrosis. However, no rat-liver damage protection was observed after 5-wk on diets based on restructured pork (RP) containing seaweed and highly enriched in cholesterol.<sup>10</sup> In addition, previous results<sup>13-18</sup> suggest that generalization on the effects of seaweeds is misleading as these vegetables display differential effects attributable to differences in their composition (e.g. total and soluble dietary fibre, mineral, vitamin, and phytochemical contents).

On the other hand, the liver is the main detoxifying organ for many toxic substances and drugs that contribute to oxidative stress.<sup>19</sup> Very recently, our group has reported that the hypocholesterolemic effect of Seaweed-RP would have a double-edge effect probably related to the CYP P450 hemo enzyme prooxidant effect.<sup>10</sup> Indications of adverse effects associated with herbal medications, which include among others, liver failure, toxic hepatitis, and death have been reported.<sup>20</sup> Increased intake of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) induces fatty acid oxidation in the liver and increase lipid peroxidation and cause severe hepatic injury.<sup>21</sup> Hepatocellular injury is accompanied by activation of the apoptotic pathways.<sup>22</sup> Cellular cycle modifications and changes in caspase-3 as indicators of apoptosis level have been used to demonstrate cellular and tissue injury.<sup>23,24</sup> To the best of our knowledge no studies on these liver damage markers have been performed in rats fed diets containing algal-RP, whether or not they were enriched in cholesterol.

As some seaweeds are hypocholesterolaemic and also antioxidants,<sup>18,25</sup> and the cholesterol elimination via cholic acid and bile induces prooxidant stress,<sup>10</sup> the hypothesis of the present paper is that, in the short-term, seaweed-enriched-RP check liver-cell cycle modification and damage induced by cholesterol consumption. Moreover, the protective effects are different and depend on the seaweed included in the RP. Thus, the objective of this paper was to study the short-term protective effect on the liver cellular cycle and apoptosis (measured as liver cytochrome c expression and caspase-3 activity) in Wistar rats which consumed algal-RP as part of hypercholesterolaemic diets.

## Materials and methods

### Materials

Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*) and Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*) were obtained from a local supplier (Algamar C.B., Redondela, Pontevedra, Spain). These seaweeds were ground in a mill (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Germany), passed through a screen with an aperture of 0.25 mm and stored in plastic flasks at  $4 \pm 2$  °C until used. Raw meat materials (post-rigor pork and pork backfat), seaweeds and additives (sodium chloride, sodium tripolyphosphate and sodium nitrite) were used as reported by Cofrades et al.<sup>26</sup> Table I gives information on protein, fat, soluble and insoluble fibre, and ash of the different RP employed for diet preparation.

### Diet preparation and experimental design

Eight experimental semi-synthetic diets (table I) were prepared: (a) the control RP diet (C) contained 85% rodent feed (AIN-93 M, purified rodent diet; Dyets #180729, DYETS, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 15% freeze-dried control RP to which 4% cellulose had been added; (b) the Cholesterol-control RP diet (CC) was identical to the C diet but with 2.43% cholesterol (95%-98% purity) and 0.49% cholic acid (> 98% purity) substituting an equal amount of starch (AIN-93 M # 180730 diet); (c) the cholesterol Wakame RP diet (CW) consisted of a mixture of AIN-93 M #180730 feed (85%) and freeze-dried Wakame RP (15%); (d) the Cholesterol-Nori RP diet (CN) was a mixture of AIN-93 M #180730 feed (85%) and freeze-dried Nori RP (15%); (e) the cholesterol-Sea Spaghetti RP diet (CS) consisted of a mixture of AIN-93 M #180730 feed (85%) and freeze-dried Sea Spaghetti RP (15%). Details of experimental diet composition are summarized in table I.

This experiment was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid



**Table I**  
Composition of the experimental diets containing restructured pork (RP)

	Control	CC	CW	CN	CS
<i>Diet AIN-93M<sup>a</sup> (g/kg diet)</i>					
Maize starch	382.75	353.59	353.59	353.59	353.59
Cholesterol		24.31	24.31	24.31	24.31
Cholic acid		4.85	4.85	4.85	4.85
<i>Pork (freeze-dried)<sup>b</sup> (g/kg diet)</i>					
Control restructured pork <sup>b</sup>	150	150			
Wakame-, Nori- or Sea Spaghetti-RP <sup>b</sup>			150	150	150
Soluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>			1.1	1.33	1.35
Insoluble fibre (g/100 g wet matter) <sup>c</sup>	2.81	2.81	1.2	0.66	1.46
Polyphenols (as gallic acid equivalent/100g wet matter) <sup>c</sup>	Tr	Tr	820	2170	2570

Control, control diet containing control restructured pork, CC, control diet added with cholesterol and cholic acid containing control RP; CW, CN, and CS, Diets containing Wakame (*Undaria pinnatifida*) Nori (*Porphyra umbilicalis*) and Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*) RP added with cholesterol and cholic acid.

<sup>a</sup>Other ingredients (g/kg diet): casein, 127.5; soyabean oil, 34; dyetose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 131.75; sucrose, 85; microcrystalline cellulose, 42.5; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.53; t-butylhydroquinone, 0.0068.

AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate-H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P, 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate-9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate-12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1%), 2.50; vitamin A palmitate (500,000 IU/g), 0.80; vitamin D3 (400,000 IU/g), 0.25; vitamin K1-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

<sup>b</sup>Protein (g), fat (g), minerals (g) (ash) and fibre (g) present in the 150 g of Control, Wakame, Nori and Sea Spaghetti freeze-dried restructured-pork; Control restructured pork: 76.99, 51.52, 15.61 and 4 (microcrystalline cellulose), respectively; Nori-restructured pork: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.0, respectively; Wakame-restructured pork: 73.94, 53.10, 17.40 and 3.45; Sea Spaghetti restructured pork: 69.56, 51.25, 15.05 and 14.12.

<sup>c</sup>Data in restructured pork<sup>27</sup>.

(Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986.

#### Animals and maintenance

Thirty Wistar rats with a body weight of approximately 90 g at the outset, obtained from Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona (Spain), were kept in a temperature-controlled room (22.3 ± 1.8° C) with a 12 h light-dark cycle for 1 week to adapt to environmental conditions and fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain). Rats were later distributed into 5 groups of 6 animals each. The Control group received the C diet while the CC, CW, CN, and CS groups received their respective experimental diets enriched in cholesterol and the different RP. Water and food were provided ad libitum. Diets contained approximately 20.7% protein, 8.7% fat, and 4.2% total dietary fibre. At the end of the experiment, rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight) and euthanized by blood extraction from descendent aorta.

#### Food consumption and body weight change

Food intake was checked daily and body weights were measured at the start and end of the experimental week.

#### Plasma cholesterol

Plasma cholesterol was determined by the enzymatic colorimetric method of SPINREACT (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).

#### Liver perfusion

Livers were prepared for perfusion, caspase-3 activity, and flow cytometry analysis of DNA content, taking one animal at a time from each of the 5 experimental groups. Hepatocytes were isolated from rats by the collagenase perfusion technique as previously described.<sup>28</sup> The viability of isolated hepatocytes (> 90%) was assessed by trypan blue exclusion as previously described.<sup>29</sup>

#### DNA content and cellular cycle evaluation

10<sup>6</sup> isolated viable hepatocytes were stained with propidium iodide following the multistep procedure of Vindelov et al.<sup>30</sup> The emitted fluorescence of the DNA-propidium iodide complex was assayed in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, California, USA) in the FL2-A channel. A double discriminator module was used to distinguish between signals coming from a single nucleus and those produced by nuclear aggregation. Data analysis was carried out by



Table II

Body weight gain, feed consumption, conversion index, and plasma cholesterol in Wistar rats fed the control diet (C), the cholesterol-control diet (CC), the cholesterol-Wakame diet (CW), the cholesterol-Nori diet (CN), and the cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS)

	Body weight gain (g)	Feed consumption (g)	Conversion index (g/g)	Plasma cholesterol (mmol/L)
Control	36.9 ± 5.0	127.3 ± 8.0	0.29 ± 0.04	1.37 ± 0.13 <sup>a</sup>
CC	35.6 ± 4.3	118.3 ± 5.3	0.30 ± 0.02	2.23 ± 0.19 <sup>c</sup>
CW	38.8 ± 5.9	120.5 ± 5.6	0.32 ± 0.02	1.99 ± 0.21 <sup>c</sup>
CN	37.4 ± 10.1	119.3 ± 12.4	0.31 ± 0.06	1.68 ± 0.14 <sup>b</sup>
CS	37.6 ± 7.8	117.7 ± 7.1	0.32 ± 0.04	1.66 ± 0.11 <sup>b</sup>
ANOVA (P)	0.345	0.467	0.155	< 0.001

Each value is the mean ± SD of six determinations. For diet composition details see table I and text. Columns with unlike superscript letters were significantly different (at least,  $p < 0.05$ ).

evaluation of single inputs ( $10^4$  nuclei/assay) and was expressed as the percentage of DNA distribution in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population (2C), S1 population (2C → 4C), G<sub>2</sub> + M tetraploid population (4C) phases of the cell cycle. The C DNA index was calculated as G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean seaweed-RP divided by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean of C-RP. CC DNA index was calculated as G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean seaweed-RP divided by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean of CC-RP.

#### Liver Caspase-3 activity assay

The caspase-3 activity was measured as a marker of cell apoptosis. Fluorometric assays of caspase-3 activity were conducted as described previously,<sup>31</sup> with some modifications, in 96-well clear-bottom plates, and all measurements were carried out in triplicate wells. To each well, 100 µl of assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10% glycerol, 10 mM dithiothreitol) was added. The peptide substrate for caspase-3 (AC-DEVD-AMC) was added to each well up to a final concentration of 20 µM. Cells were lysed with 100 µl of lysis buffer, vortexed for 30 min and centrifuged at 13,000 g for 5 min at 4° C. Protein concentrations in the supernatants were determined using the Bradford method.<sup>32</sup> Cell lysates (20 µg protein) were added to start the reaction. Fluorescence was measured on a fluorescence plate reader at 360 nm excitation and 460 nm emission after 1 hour in incubation at 37° C. Caspase activity was calculated as [(mean AMC fluorescence from triplicate wells)-(background fluorescence)]/µg protein.

#### Assessment of liver apoptosis of cytochrome c

Tissue samples were homogenized for 5 min in PBS buffer at a ratio of 100 mg tissue/0.5 mL PBS. The homogenates were placed on ice and then centrifuged at 12,000 g for 30 min. 40 µg of protein sample was

loaded and analysed by Western blot analysis. Briefly, proteins were separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Belford, NJ, USA). Membranes were blocked with blocking buffer (PBS-T containing 0.1% Tween 20) for at least 1 h with primary antibody in the above solution on an orbit shaker at 4° C overnight. Incubation was followed by washing with PBS and incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit) in 1:1000 dilution for 1 h at room temperature. β-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA) was used as loading control.

#### Statistical analyses

All results were expressed as the means ± SD of six animals in duplicate. Differences between groups were analysed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc study. Statistical analyses were conducted using the SPSS version 15.0 statistical analysis packages. Differences were accepted as significant when  $p \leq 0.05$ .

#### Results

##### Feed intake, body weight gain and feed conversion

No significant effects were observed in feed consumption, bodyweight increase or conversion rate ( $p > 0.05$ ) (table II).

##### Plasma cholesterol

Cholesterol in diet increased plasma cholesterolemia in all groups ( $p < 0.001$ ). However, CN and CS diets induced lower plasma cholesterolemia than C and CW groups ( $p < 0.05$ ) (table I).





Table III

Quantitative analysis of DNA ploidy (%) in cell cycle (sub G<sub>1</sub> phase (cell death zone), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, S phase, G<sub>2</sub>/M phase), DNA index, in isolated hepatocytes of Wistar rats fed the control diet (C), the cholesterol-control diet (CC), the cholesterol-Wakame diet (CW), the cholesterol-Nori diet (CN), and the cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS)

Cell contribution	Sub G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S phase	G <sub>2</sub> /M	C DNA index <sup>a</sup>	CC DNA index <sup>a</sup>
C	5.3 ± 2.10	78.6 ± 2.2	3.6 ± 1.3	12.4 ± 1.6		1.08 ± 0.06
CC	12.8 ± 3.01 <sup>a</sup>	73.0 ± 2.9	4.0 ± 0.50	10.1 ± 1.9	0.93 ± 0.20	
CW	8.4 ± 2.1 <sup>ab</sup>	71.9 ± 4.7	4.3 ± 1.0	15.0 ± 3.4	0.91 ± 0.21	0.98 ± 0.06
CN	7.5 ± 3.0 <sup>ab</sup>	74.0 ± 1.7	5.3 ± 1.1	13.2 ± 3.0	0.94 ± 0.08	1.01 ± 0.02
CS	5.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	74.6 ± 1.4	5.2 ± 1.8	14.4 ± 2.0	0.95 ± 0.10	1.02 ± 0.12
ANOVA (P)	0.030	0.092	0.344	0.120	0.616	0.616

Each value is the mean ± SD of six determinations. Columns with unlike superscript letters were significantly different (at least,  $p < 0.05$ ). Sub G<sub>1</sub> is expressed as the percentage of cell death zone. The values are expressed as the percentage of DNA in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population (2C), S1 population (2C → 4C), G<sub>2</sub> + M tetraploid population (4C) phases of the cell cycle.

<sup>a</sup>The C DNA index was calculated as G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean seaweed-RP divided by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean of C-RP.

<sup>a</sup>The CC DNA index was calculated as G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean seaweed-RP divided by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> diploid population mean of CC-RP.

#### Hepatocyte cellular cycle and DNA content

Table III shows the percentage of cell cycle populations in relation to ploidy and DNA content. For the percentage of apoptotic cells (sub G<sub>1</sub>), content of DNA lesser 2n, analyzed in the cell cycle was affected by diet ( $p = 0.030$ ) and increased 2.5 fold in the CC vs. C animals. The sub G<sub>1</sub> was significantly decreased by CS when compared to CC rats, while no difference was observed when compared to the C group. By contrast, CN and CW resulted in a decreased sub G<sub>1</sub> although no significant respect CC groups. Non-significant differences were observed in the pattern of DNA distribution and DNA indices between groups CC DNA index.

#### Caspase-3 activity assay

Caspase-3 activity was assayed in liver cytosolic fraction in all experimental groups and is presented in

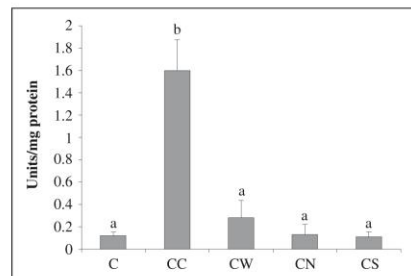


Fig. 1.—Caspase-3 activity was determined in isolated hepatocytes of Wistar rats fed the control diet (C), the cholesterol-control diet (CC), the cholesterol-Wakame diet (CW), the cholesterol-Nori diet (CN), and the cholesterol-Sea Spaghetti diet (CS). Data are the mean ± SD of six animals per group. Bars bearing different letters were significantly different (at least  $p < 0.05$ ).

figure 1. There was a significant increase in the caspase-3 activity in hypercholesterolemic rats when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The caspase-3 activity was significantly decreased by algae-diets when compared to hypercholesterolemic rats ( $p < 0.001$ ). CS, CW, and CN displayed no differences ( $p > 0.05$ ) when compared to the C group.

#### Cytochrome c expression

The release of mitochondrial cytochrome c into cytosol is one indicator of perturbation of mitochondrial membrane stability. We further detected cytochrome c protein levels in cytosol using western blot analysis. Immunoblot analysis showed higher release of cytosolic cytochrome c in CC rats in comparison to the C group ( $p < 0.05$ ), while a consequent diminution of mitochondrial cytochrome c levels was observed when compared to the C group. Cytosolic cytochrome c protein levels analyzed by quantitative densitometry were increased by 250% ( $p < 0.05$ ) in CC rats compared with the C group. The levels of cytosolic cytochrome c were decreased by CN and CS groups compared with the CC animals, while no difference was observed when compared to the C group (fig. 2).

#### Discussion

The experiment was designed to test possible benefits of 1-wk consumption of seaweed-RP as part of cholesterol enriched diets on liver apoptosis and DNA cell cycle. For the first time, flow cytometry analyses were tested in seaweed-RP diets both with and without added cholesterol. Rat groups present similar food acceptance and feed conversion; thus results should be related to differences in composition of seaweeds. The inclusion of cholesterol in diet promptly and highly affected the cholesterolemia; however, clear diffe-





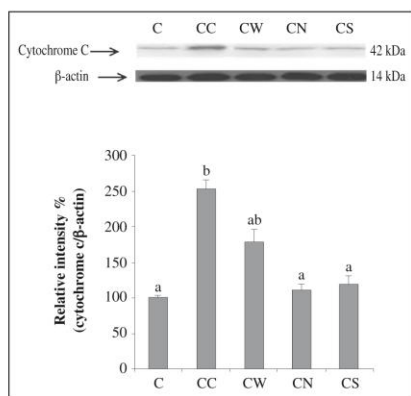


Fig. 2.—Immuno-detection of cytochrome c released to cytosol in liver of rats fed the control (C), the cholesterol-control (CC), the cholesterol-Wakame (CW), cholesterol-Nori (CN), the cholesterol-Sea Spaghetti (CS) diets.  $\beta$ -actin was used as internal control for cytosolic fraction. The results, expressed as arbitrary units (AU), are the mean  $\pm$  SD of 6 animals per group. Bars bearing different letters were significantly different (at least  $p < 0.05$ ).

rences were observed between groups as CC increased plasma cholesterol 64%, CW 43%, and CN and CS by 25%. Semisynthetic casein-based diets with added cholesterol have been found to increase cholesterolemia in medium<sup>19,33</sup> and large-term studies.<sup>16</sup> However, the hypocholesterolaemic effects observed due to seaweed inclusion were different and highly dependent on the type of alga included in diet.<sup>1,16</sup> According to Ren et al.,<sup>34</sup> some seaweed polysaccharides exert hypolipemic effects in rats fed a diet rich in sodium and cholesterol. However, sodium alginate, funoran, porphyran, and carrageenan were found to interact with dietary cholesterol to facilitate its excretion, whilst dietary agar was almost inactive.<sup>35</sup>

Mammal livers contain polyploid hepatocytes, whose number depends on the animal's age and species.<sup>36</sup> Thus, rat foetal hepatocytes are mainly diploids (85.3% of cells are in the diploid phase), 7.3% in DNA synthesis phase and 7.4% polyploids (tetraploids plus octoploids).<sup>37</sup> In the current study, the diploid phase accounted for 73.0 to 78.6 % and tended to decrease after cholesterol feeding, while S plus tetraploid phases represented 14.1 to 19.6%. Apoptosis increased by cholesterol feeding in CC rats but CS rats showed similar apoptotic level to the C group while CW and CN intermediate values with respect to those of CC and CN groups. The necrosis-regeneration process is characterized by a change in the distribution of different populations of hepatocytes and, while normal hepatocytes have stability in their DNA content and chromosome organization, proliferative state of hepatocytes (regenerating) are involved in the replica-

tion process through the cell cycle including DNA synthesis programmed to duplicate the genomic material of the cell before its division. Regenerating cells, therefore, have a higher DNA content than quiescent cells (resting phase) and this content can vary in each cycle according to the progression of DNA synthesis. Thus, according to the cellular apoptosis/cellular DNA the inclusion of seaweed to RP diets induced moderate antiapoptotic effects, mostly in the CN diet.

Free radicals induce oxidative stress, which is balanced by the body's endogenous antioxidant systems with an input from co-factors, and by the ingestion of exogenous antioxidants. Disturbances in mitochondrial membrane permeability cause leakage of free radicals and cytochrome c from the mitochondria to the cytosol. Once cytochrome c is released into the cytosol, it binds to another protein, Apaf-1, and promotes activation of the caspase cascade, leading to cell death.<sup>38</sup> In CC diet-fed rats, the levels of cytosolic cytochrome c and the activation of caspase-3 were much greater than those of the C group. This indicates that the release of cytochrome c into the cytosol is due to mitochondrial membrane damage, which is induced by increased levels of radicals. Cytosolic cytochrome c activates protease activators (caspases), and this may cause further apoptosis, which is also supported from the cellular cycle-DNA content. As also reported by Zamora et al.,<sup>39</sup> dietary cholesterol increased apoptosis. However, the inclusion of alga blocked those effects in the CS group, which remained at basal levels, while CW and CN diets partially blocked the apoptotic effect of dietary cholesterol. However, seaweeds contain antioxidants and other substances that probably block the negative effect on the antioxidant status of reducing plasma cholesterol. Thus, some amino acids and antioxidant activity molecules (e.g. zinc)<sup>40</sup> of red and brown seaweeds have been reported to be antiapoptotic.<sup>39</sup> In addition, vitamins A and E, and some polyphenols present in seaweeds could act as antioxidants and have a role in the partial antiapoptotic effects observed. Fucose-containing sulphated polysaccharides extracted from *Sargassum* sp. and from *Fucus vesiculosus* respectively have been reported to induce growth inhibition and apoptosis of melanoma B16 cells *in vitro*.<sup>41,42</sup>

The pro-apoptotic effect of dietary cholesterol and the antiapoptotic effect of seaweed-RP diet were also supported by the results of caspase-3 activity. In fact CW, CN, and CS rats displayed much lower caspase-3 activities than their CC counterparts. Similarly, cytosolic cytochrome c expression increased 2.5-fold in CC animals and decreased to C rat values with consumption of CN and CS diets. All these results suggest that algal compounds, mostly in the case of CS and CN, blocked the proapoptotic effect of dietary cholesterol and reduced the release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol occurring in CC rats. Thiruchenduran et al.<sup>43</sup> reported that the increase in the expression of caspase-3 and cytochrome c observed in cholesterol fed



rats was partially blocked in the grape seed proanthocyanidin-treated group via their ability to reduce, directly or indirectly, free radicals production. Although we did not measure free radical production in this short-term experiment, CN and CS diets probably reduced free radical levels via algal antioxidants and other compounds, consequently maintaining mitochondrial membrane permeability.<sup>18</sup> This would, in turn, lead to tissue damage and/or apoptosis reduction. Mohamed et al.<sup>44</sup> reported that seaweed consumption increases the antioxidant endogenous production *in vivo* and that malondialdehyde were significantly reduced in liver and other organs of aging animals by porphyrans and sulphated galactans from *Porphyra* spp. However, a histological study performed in Wistar rats fed the same RP showed, after 5-wk treatment, that the antiapoptotic and other protective effects were lost.<sup>10</sup> As in the Schultz Moreira et al.<sup>10</sup> study plasma cholesterol were much higher than those observed in the present study, it must be suggested that long-term cholesterol feeding must increase plasma cholesterolemia to a level that implies a high cholesterol to cholic acid conversion.<sup>44</sup> In the cholesterol to bile acids conversion, the cytochrome P450 7A-1 hemoenzyme is induced, highly increasing the production of free radicals.<sup>45,46</sup> This effect probably blocks the protection again apoptosis observed in the present short-term study and deserve future studies.

### Conclusion

In summary, in this 1-week short-term study, sea Spaghetti-RP, and Nori-RP to a lesser extent, reduced the apoptosis induced by cholesterol feeding. More studies are needed to understand the results obtained and to ascertain the utility of consuming algal-RP as part of very cholesterol-rich diets.

### Acknowledgements

This study was supported by the Spanish project AGL-2011-29644-C02-02 and Consolider-Ingenio 2010 # CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the predoctoral fellowship awarded to Adriana Schultz Moreira by the Universidad Complutense, Madrid, Spain.

### References

- Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food* 2009; 2: 236-58.
- Pauwels EK. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract* 2011; 20: 103-11.
- Solfrizzi V, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, D'Onofrio G, Addante F, Sancarlo D, Cascavilla L, Pilotto A, Panza F. Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 520-42.
- Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán EI. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr Hosp* 2006; 21: 369-73.
- Cofrades S, López-López I, Bravo L, Ruiz-Capillas C, Bastida S, Larrea MT, Jiménez-Colmenero F. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int* 2010; 5: 361-70.
- Jiménez Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, and collaborators. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem* 2010; 123: 959-67.
- Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 2012; 27: 31-45.
- Babio N, Balanzá R, Basulto J, Bulló M, Salas-Salvadó J. Fibra dietética: influencia sobre el peso corporal, el control glicémico y el perfil del colesterol plasmático. *Nutr Hosp* 2012; 27: 327-40.
- Sánchez-Muniz FJ, Cava F, Viejo JM, Bastida S, Higon E, Marcos A. Olive oil-fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell-damage marker enzymes. *Nutr Res* 1996; 16: 111-21.
- Schultz Moreira AR, García-Fernández RA, Bocanegra A, Méndez MT, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus MI, Sánchez-Muniz FJ. Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolemia and liver damage. *Food Chem Toxicol* 2013; 56: 223-30.
- Yokogawa K, Matsui-Yuasa I, Tamura A, Terada M, Kojima-Yuasa A. Inhibitory effects of Ecklonia cava extract on high glucose-induced hepatic stellate cell activation. *Mar Drugs* 2011; 9: 2793-808.
- Kuriakose GC, Kurup MG. Antioxidant and antihepatotoxic effect of Spirulina laxissima against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Food Funct* 2011; 2: 190-6.
- Bocanegra A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 696-702.
- Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br J Nutr* 2008; 99: 272-80.
- González-Torres L, Churruarín I, Schultz Moreira AR, Bastida S, Benedí J, Portillo MP, Sánchez-Muniz FJ. Effects of restructured pork containing Himanthalia elongata on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo- and hypercholesterolaemic rats. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2012; 5: 158-67.
- Olivero-David R, Schultz-Moreira A, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br J Nutr* 2011; 106: 1476-86.
- Mišurcová L, Mach L, Orsáková J. Advances in food and nutrition research: Marine medicinal foods: Implications and applications, macro and microalgae. In: Se-Kwon, K. (Eds.), Seaweed Minerals as nutraceuticals. Marine bioprocess research center, Department of Chemistry, Pukyong National University, pp. 371-86. Busan, 2011.
- Moreira AS, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65: 290-8.
- Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska PE, Skibbska B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 2011; 63: 849-58.
- Ernst E. Serious adverse effects of unconventional therapies for children and adolescents: a systematic review of recent evidence. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 72-80.
- Rukkumani R, Aruna K, Suresh Varma P, Padmanabhan Menon V. Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose-dependent study. *J Med Food* 2004; 7: 456-61.

22. Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 360-369.
23. Bautista M, Andres D, Cascales M, Morales-González JA, Sánchez-Reus MI. Effect of gadolinium chloride on liver regeneration following thioacetamide-induced necrosis in rats. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 4426-40.
24. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 402-10.
25. Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs* 2011; 9: 1056-100.
26. Cofrades S, López-López I, Solas MT, Bravo L, Jiménez-Colmenero F. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci* 2008; 79: 767-76.
27. López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz FJ, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci* 2009; 83: 492-8.
28. Seglen PO. Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. In: Tyson CA, Frazier JM, editors. *Methods in toxicology in vitro biological systems*. Academia Press; pp. 231-43, New York, NY, USA, 1993.
29. Díez-Fernández C, Sanz N, Cascales M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1159-63.
30. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* 1983; 3: 323-7.
31. Bijur GN, De Sarno P, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem* 2000; 275: 7583-90.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
33. Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, Bastida S, Viejo J. Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolaemic rats. *J Nutr* 2003; 133: 2302-8.
34. Ren D, Noda H, Amano H, Nishino Y, Nishizawa K. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish Sci* 1994; 60: 83-8.
35. Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre from Edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 2000; 20: 585-98.
36. Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, Jull N, Pettersen EO, Seglen PO. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis* 1988; 9: 939-45.
37. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 1993; 4: 912-8.
38. Tien YC, Liao JC, Chiu C, Huang TH, Huang CY, Chang WT, Peng WH. Esculetin ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 4053-67.
39. Zamora JD, Otárola IC, Brenes O. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev Chil Nutr* 2005; 32: 178-90.
40. Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 840-5.
41. Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. *Int J Biol Macromol* 2011; 49: 331-6.
42. Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 *in vitro*. *Mar Drugs* 2011; 9: 2605-21.
43. Thiruchenduran M, Vijayan NA, Sawaminathan JK, Devaraj SN. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc Pathol* 2011; 20: 361-8.
44. Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol* 2012; 23: 83-96.
45. Schultz Moreira AR, Benedit J, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem* 2011; 129: 1623-30.
46. Micheletta F, Luliano L. Free Radical Attack on Cholesterol: Oxysterols as Markers of Oxidative Stress and as Bioactive Molecules. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* 2006; 6: 305-16.
47. Tabrez S, Ahmad M. Cytochrome P450 system as potential biomarker of certain toxicants: comparison between plant and animal models. *Environ Monit Assess* 2013; 185: 2977-87.

**5.8. PUBLICACIÓN N°8.**

**BMC Complementary and Alternative Medicine** (2013). En segunda revisión. **ISI Web. JCR. (2012)**. Índice impacto: 2,082 (7 de 21 en Integrative & Complementary Medicine)

**Efectos antidiabéticos *in vitro* de las algas *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* y *Porphyra umbilicalis* en la difusión de la glucosa y actividad de la alfa-glucosidasa**

Adriana R. Schultz Moreira; Alba Garcimartín; Juana Benedí; Sara Bastida; Antonio Jiménez-Escrig; Pilar Rupérez; Brian D. Green; Eamon Rafferty; Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Las propiedades anti-hiperglicémicas fueron reportadas, aunque los mecanismos involucrados permanecen desconocidos. Los extractos soluble de cloroformo, etanol y agua de *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Himanthalia elongata* (Espagueti de mar) y *Porphyra umbilicalis* (Nori), fueron utilizadas para testar el efecto inhibitorio *in vitro* de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa y difusión de la glucosa. Solamente los extractos de Espagueti de Mar poseyeron significativamente efectos inhibitorios de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa (menor producción de glucosa mmol/L en 26,2% que el control,  $p < 0,05$ ) en el tiempo final de incubación 75 minutos. En este estudio, el alga Espagueti de Mar distinguiese de las otras algas y la fibra soluble y polifenoles pueden estar involucrados. Después de 6 horas, los extractos de cloroformo-Nori, etanol-Nori, etanol-Espagueti de Mar, agua-Nori y agua-Wakame significativamente inhibieron la difusión de la glucosa en diferentes grados (22.2%, 20.5%, 65.0%, 12.5% y 60.2% vs. control, respectivamente). Los extractos de etanol-Espagueti de Mar y agua-Wakame poseen los efectos más altos en inhibir la difusión de la glucosa, despliegan los más bajos niveles de slopes para ajustes lineales (68.2% y 62.8% vs. control, respectivamente) y el área de bajo de la curva (57.8% y 49.3% vs. control, respectivamente). Los resultados sugieren que los extractos acuoso, cloroformico, y etanólico de las tres algas difieren en los efectos en la difusión de la glucosa y actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa, sugiriendo que los efectos hipoglicémicos de las algas son multifacética y no necesariamente concatenados.

1 **Antidiabetic effects of *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* seaweeds on *in***  
2 ***vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity**

3  
4 **Adriana R. Schultz Moreira · Alba Garcimartín · Sara Bastida · Antonio Jiménez-Escrig · Pilar Rupérez ·**  
5 **Brian D. Green · Eamon Rafferty · Francisco J. Sánchez-Muniz · Juana Benedí**

6  
7 **A. R. Schultz Moreira · A. Garcimartín · S. Bastida · F. J. Sánchez-Muniz**

8 Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición); Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de  
9 Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain; Phone: +34913941828; FAX: +34-9193941810; e-mail:  
10 [frasan@farm.ucm.es](mailto:frasan@farm.ucm.es)

11 **A. Jiménez-Escrig · P. Rupérez**

12 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN, CSIC). José Antonio Novais 10, Ciudad  
13 Universitaria, 28040-Madrid, Spain.

14 **J. Benedí (\*)**

15 Departamento de Farmacología; Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y  
16 Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain; Phone: +34913941828; FAX: +34-9193941810; e-mail: [jbenedi@ucm.es](mailto:jbenedi@ucm.es)(\*)

17 **B. D. Green · E. Rafferty**

18 Institute for Global Food Security; Biological Sciences, Queen's University, Belfast BT9 5AG, Northern Ireland,  
19 UK.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

## Abstract

**Background:** Seaweeds are good sources of total and soluble/viscous dietary fibre, which can influence satiety and glycemic control and thus, can exert beneficial effect in the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. The present study aims to investigate and compare the *in vitro* inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase and glucose diffusion models by chloroform-, ethanol- and water-soluble extracts from *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Himanthalia elongata* (Sea spaghetti) and *Porphyra umbilicalis* (Nori).

**Methods:** Water, ethanol or chloroform seaweeds extracts were obtained and their phenol content analysed. The extract effects on  $\alpha$ -glucosidase activity and glucose diffusion across the gastrointestinal tract were investigated. Principal Components Analysis (PCA) was applied to highlight extract similarities/differences on glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase effects.

**Results:** Only water extracts of Sea spaghetti possessed significant *in vitro* inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase activity and induced a steady state inhibition ( $P < 0.001$ ) after 30 min experiment. This effect was about 30% lower than that of the positive control acarbose. Ethanol-Sea spaghetti and water-Wakame extracts exerted the highest inhibitory effects on glucose diffusion, as they displayed the lowest slopes for lineal adjustments (68.2% and 62.8% vs. control, respectively) and area under the curve (57.8% and 49.3% vs. control, respectively). After 6 h, chloroform-Nori, ethanol-Nori, ethanol-Sea spaghetti, water-Nori and water-Wakame extracts significantly inhibited glucose diffusion to different extent (22.2%, 20.5%, 65.0%, 12.5% and 60.2% vs. control, respectively). PCA test clearly distinguished Sea spaghetti effects from those of the other algae, supporting that soluble fibre and polyphenols were involved.

**Conclusions:** Results suggests that seaweed hypoglycemic/antidiabetic effects are multi-faceted and not necessarily concatenated. Ethanol-Sea spaghetti and water-Wakame extracts exert the highest glucose diffusion inhibitory effects while water-Sea spaghetti extract the highest  $\alpha$ -glucosidase activity inhibition. These extracts deserve future studies to find out specific bioactive compounds or specific compounds mix involved.

**Keywords** Glucose diffusion ·  $\alpha$ -glucosidase · antihyperglycemic effect · Seaweed extracts

## Background

Growing evidence suggests that abnormal increases in postprandial glycemia are a key risk factor for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) and metabolic syndrome (MS) [1]. Reducing postprandial hyperglycemia through inhibiting carbohydrate-digestive enzymes and/or delaying glucose absorption in the small intestine, are central

61 aspects in the blood glucose level control [2].  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors, such as acarbose, are prescribed for  
62 T2DM patients to control their blood glucose levels [3, 4]. Several authors have reported the positive influence  
63 of fibre on glycemic control in T2DM patients [5].

64 Seaweeds are good sources of total and soluble/viscous dietary fibre, which can influence satiety and  
65 glucose uptake [6]. Furthermore, they contain fibre-associated bioactive compounds, such as polyphenols [7-9].  
66 Iwai [3] found some antidiabetic effects, based on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, of the phlorotannins  
67 present in the brown alga *Ecklonia stolonifera*. Fucoxanthin (the main carotenoid in brown seaweed) has been  
68 found to help lower bodyweight [10]. Cofrades et al. [11] have concluded that *Porphyra*, *Undaria*, and  
69 *Himanthalia* offer considerable potential as functional food ingredients, which can produce many different kinds  
70 of biological activities, and also for their high antioxidant capacity and potential effects on glycemia. Thus, these  
71 three algae have been employed as ingredients in functional meat product [12, 13]. In order to search for the  
72 health benefits of seaweeds, the use of several *in vitro* models to screen for highly potential activities of different  
73 seaweed extracts could be a useful approach [14]. The measurement of glucose movement across dialysis  
74 membrane into external solution is considered a convenient model for assessing factors affecting glucose  
75 absorption *in vitro* [15]. However, few studies have examined the effect of seaweed extracts on glucose  
76 diffusion. Similarly,  $\alpha$ -glucosidase activity is a useful tool to test inhibitory effects on carbohydrate digestion  
77 [16].

78 Algal extracts present a very complex composition, thus, their compounds identification results difficult  
79 and tedious. Extracting solvents will determine extracts composition as groups of compounds appear related to  
80 solubility in the solvent used. Soluble dietary fibre (SDF) is mostly found in water-soluble extracts [17, 9, 18],  
81 while pigments and non-polar fats in chloroform extracts [19], and polyphenols and polar fats in ethanol extracts  
82 [20]. Consequently, the properties/effects of algal extracts (e.g. antihyperglycemic) could be related, at least  
83 indirectly, to major compounds present in them. Principal Component Analysis (PCA) would help to easily  
84 understand which seaweed extracts would exert better antihyperglycemic properties and the bioactive compound  
85 candidates involved.

86 As natural ingredients from seaweeds can exert potential benefits on glucose metabolism and diabetes [6, 3,  
87 2], in this paper we hypothesized that chloroform-, ethanol- and water-soluble algal extracts would possess  
88 different effects on glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity.

89 Thus, taking into account the aforementioned information, the present study was undertaken to obtain  
90 ethanol-, chloroform-, and water-soluble extracts from three commonly consumed algae *Undaria pinnatifida*



(Wakame), *Himanthalia elongata* (Sea spaghetti) and *Porphyra umbilicalis* (Nori), in order to investigate their *in vitro* effects on glucose absorption and  $\alpha$ -glucosidase inhibition.

## Methods

### Seaweeds samples and preparation of the seaweed extracts

Freeze-dried algae *Undaria pinnatifida*, *Porphyra umbilicalis*, and *Himanthalia elongata* were obtained from Algamar (Pontevedra, Spain). These seaweeds were finely powdered and stored at room temperature ( $20 \pm 2$  °C) in opaque screw-top jars until analysis. Extraction of seaweed was carried out according to an infusion method reported by Gray and Flatt [21, 22], using high polarity solvents such as water and ethanol; and medium polarity solvents such as chloroform. Then, one gram of the powdered sample was placed for infusion in 40 mL of boiling distilled water, ethanol (95% v/v) or chloroform, depending on the extract required, and stirred thoroughly. The mixture was transferred into a 50 mL centrifuge tube and placed onto a roller mixer for 15 min. The tubes were closed with Teflon caps and centrifuged for 10 min at 4,000 rpm ( $2,500 \times g$ ) at 4 °C and each supernatant was collected into bijoux tubes. Aliquots of extracts (5 mL) were dried under vacuum (Savant SPD121P Speed Vac, Labcare, Buckinghamshire, England), stored at -20 °C and reconstituted with PBS buffer (0.002 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.14 M NaCl) pH 7.4 at 4 °C just before use.

### Total phenolic content

Phenolic contents of extracts were estimated by the method of Taga et al. [22]. Briefly, 100  $\mu\text{L}$  aliquot of sample was mixed with 2.0 mL of 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and allowed to stand for 2 min at room temperature. After incubation, 100  $\mu\text{L}$  of 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent was added, and the reaction mixture was mixed thoroughly and allowed to stand for 30 min at room temperature in the dark. Absorbance of all the sample solutions was measured at 720 nm using spectrophotometer (Shimadzu, UV-160, Japan). Phenolic contents are expressed as Gallic acid equivalent per gram (GE/g). All tests were carried out in triplicate and the results were presented as means  $\pm$  SD.

### $\alpha$ -Glucosidase activity measurement

$\alpha$ -Glucosidase, as maltase activity, was tested measuring the production of glucose from maltose solution according to Mai et al. method [23]. Rat intestinal acetone powder (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was

121 homogenised in a maleate buffer (pH 6.0). The homogenate was centrifuged at 3,000 rpm 10 min and the  
122 supernatant obtained was used as crude enzyme solution for assay. In short, a mix of 300  $\mu$ L of maltose (20  
123 mg/mL) and 150  $\mu$ L of the different dried seaweed extracts reconstituted with PBS buffer to the concentration of  
124 50 g/L were pre-incubated at 37 °C for 5 min. Afterwards, 150  $\mu$ L of crude enzyme solution was immediately  
125 added, and the reaction mixture vortexed and incubated at 37 °C. PBS buffer was used as a blank control.  
126 Acarbose, 1 mg/L in PBS buffer, was used as positive control as it has being referenced as  $\alpha$ -glucosidase  
127 inhibitor [3,4]. Glucose concentrations were measured at 15, 30, 45, 60 and 75 min on a Microstat P-GM7  
128 portable analyser (Analox Instruments USA Inc, Lunenburg MA).  $\alpha$ -Glucosidase activity was expressed as  
129 mmol/L glucose produced *per* min. All tests were carried out in triplicate and the results were presented as  
130 means  $\pm$  SD.

131

#### 132 **Glucose diffusion measurement**

133 An adaptation of the Gallagher et al. [15] method was used to evaluate the effects of different seaweed extracts  
134 on *in vitro* glucose diffusion. Briefly, the model used in the present experiments consisted of a dialysis tube (6  
135 cm x 10 mm; dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) into which 1750  $\mu$ L of  
136 D-glucose (0.22 M) and 250  $\mu$ L of the different dried seaweed extracts reconstituted with PBS buffer to the  
137 concentration of 25 g/L were added. The dialysis bag was sealed at each end and placed in a tube containing 100  
138 mL 0.9% w/v NaCl continuously moving. Glucose on external NaCl solution was measured each 30 min for 6 h.  
139 Blank control tests were conducted with PBS buffer in the absence of seaweed samples. Glucose concentrations  
140 were measured using a Microstat P-GM7 portable analyser (Analox Instruments USA inc, Lunenburg MA,  
141 USA). All tests were carried out in triplicate and the results presented as means  $\pm$  SD. To correspond with the *in*  
142 *vivo* glucose tolerance oral test (American Diabetes Association, 2011), the areas under the curve (AUC) of  
143 glucose were plotted after 180 min and 360 min taking into account glucose concentration diffused at each 30  
144 min intervals.

145

#### 146 **Statistical analysis**

147 Glucose concentrations were plotted against incubation time and the linear adjustments were tested using the  
148 SPSS statistical package (version 19.0). Comparison between linear adjustments for the different extracts and  
149 control was checked by ANCOVA test using SAS 9.2 statistical package. Statistical comparisons between  
150 seaweed extracts were assessed by one way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. Differences were

considered significant at  $P < 0.05$ . The multivariate principal component analysis (PCA) was applied to summarise the information in a reduced number of principal components, selecting those values with eigenvalues  $>1.0$ . Then, the factors were rotated, using Varimax method, to obtain the expected weight for each extraction factor.

## Results

**Table 1** summarizes composition of some relevant compounds for the three seaweeds tested as well as their swelling, water and oil retention capacities. Nori showed the highest protein content but lowest swelling capacity, water and oil retention capacities. Sea spaghetti displayed the highest total fibre and SDF content. Nori has lower ash content than the other seaweeds (12 g/100g dm vs. 37 g/100g dm of Wakame and 30 g/100g dm of Sea spaghetti), mainly due to its lower sodium, potassium, calcium, and magnesium contents (data not shown).

The phenolic contents in all extracts were significantly different among species ( $P < 0.05$ ). All type of Sea spaghetti extracts showed higher phenolic content than their Wakame and Nori counterparts. In comparison to other solvents, ethanol extracts of Wakame and Sea spaghetti showed the highest phenolic content (25.12 and 34.43 mg GAE/g, respectively) (**Table 2**).

**Table 3** shows the effect of blank control, acarbose, chloroform, ethanol, and water extracts from seaweeds on  $\alpha$ -glucosidase activities *in vitro* at different time intervals. These activities were differently affected by the different extracts (at least  $P = 0.007$ ). Water-Sea spaghetti extract induced significant decrease in  $\alpha$ -glucosidase after 30 min (at least  $P < 0.05$ ) with respect to blank control and to the other water extracts. Ethanol-Nori and Ehanol-Sea spaghetti extracts increased  $\alpha$ -glucosidase activity with respect to blank control at 15 min ( $P < 0.05$ ). Acarbose showed throughout the whole experiment ( $P < 0.001$ ) a potent inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase activity (all extracts,  $P < 0.001$ ).

**Figure1** summarizes inhibitory effects of the different water extracts on  $\alpha$ -glucosidase activity at different time intervals expressed as percentage of inhibition. Acarbose was stated at 100% inhibition level while blank control at 0%. Water Sea spaghetti induced a steady state inhibition (about 70%;  $P < 0.001$ ) with respect to its blank control after 30 min experiment.

**Table 4** shows the effects of the different seaweed extracts tested upon glucose diffusion *in vitro*. The glucose diffusion at the different times assayed was significantly different between chloroform extracts (at least  $P = 0.046$ ), ethanol extracts (at least  $P = 0.036$ ), and water extracts (at least  $P = 0.005$ ). During the first 60 min,

two chloroform extracts (chloroform-Wakame and chloroform-Sea spaghetti), two ethanol extracts (ethanol-Wakame and ethanol-Nori), and two water extracts (water-Nori and water-Sea spaghetti) increased (at least  $P < 0.05$ ), while ethanol-Sea spaghetti decreased (at least  $P < 0.05$ ) the glucose diffusion in comparison to its respective blank control. Significant decreases in the glucose diffusion with respect to the blank control were observed for corresponding extracts of chloroform-Nori after 300 min ( $P < 0.05$ ), ethanol-Nori after 150 min (all  $P \leq 0.001$ ) and ethanol-Sea spaghetti after 120 min (at least  $P = 0.002$ ), water-Wakame after 150 min (at least  $P < 0.05$ ) and water-Nori after 180 min (at least  $P = 0.05$ ). The water-Sea spaghetti increased glucose diffusion vs. the blank control at any time tested ( $P \leq 0.001$ ).

**Table 5** shows the linear adjustments of glucose diffusion and time through the experiment for the different seaweed extracts. Blank control and all extracts in chloroform, ethanol and water were linearly adjusted ( $r^2 > 0.882$ ;  $P < 0.001$ ). ANCOVA test showed significant differences between linear adjustments of blank control vs. chloroform-Nori, and between those of chloroform-Nori vs. chloroform-Wakame (at least  $P < 0.05$ ). Significant differences were observed between linear adjustments of ethanol-Nori and ethanol-Sea spaghetti vs. the blank control, and among all ethanol algal extracts (all,  $P < 0.001$ ). Linear adjustments significantly differed between water-Wakame and water-Nori vs. blank control; and among all water algal extracts (all  $P < 0.001$ ).

**Figure 2a** shows that AUC from the extracts were significantly different ( $P < 0.001$ ; ANOVA test) except for chloroform extracts at 180 min. Ethanol-Sea spaghetti at 180 (fig 2a) and 360 min (**fig 2b**) and water-Wakame at 360 min (fig 2b) displayed significantly lower AUC values than the other extracts (at least  $P < 0.05$ ). Water-Sea spaghetti showed higher AUC ( $P < 0.05$ ) than their counterparts (fig 2a and 2b).

Since chloroform extracts were largely devoid of activity (Tables 3 and 4), PCA was conducted only on the water and ethanol extracts to investigate the relation between the soluble bioactive constituents of seaweeds and the glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity (**Table 6** and **Figures 3** and **4**). PCA was applied to identify patterns in our data and to highlight similarities/differences between extracts. Different variables were measured: four related with composition [proteins (Pr), ash, soluble polyphenols (SPP), and SDF] and eight derived from the combination of two extract types [in water and in ethanol], two experiments [glucose diffusion (GD) and  $\alpha$ -glucosidase activity (AG) both expressed as glucose concentration and inhibition percentage] at two times [medium (M) and final times (F)].

The PCA scatter plot (Figure 3) indicates that entities located to the left had the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibition percentage while those with relatively low inhibition percentage were located to the top and negative part of the plot. The first three components in the PCA explained 96.2% of the total variance in the data set

(eigenvalues = 7.023, 3.114, and 1.407, respectively). The first component (PC-1) accounted for 58.5% of the variance and correlated with the variance of glucose diffusion at medium time, and with the variance of  $\alpha$ -glucosidase inhibition at both medium and final time. PC-1 also correlated with the variance of protein and ash (positively) and polyphenol (negatively) constituents. The second component (PC-2) accounted for 22.9% of the total variance and correlated with the variance of glucose diffusion both at medium and final time, and also correlated positively with the protein constituent. The third component (PC-3) accounted for 11.7% of the total variance, and correlated with the variance of SPP and SDF (both positively), and ash (negatively) components (Table 6). Using the rotated component matrix, it could be inferred (Figure 3) that e.g. the water-Sea spaghetti, with the highest glucosidase inhibition percentage, was located further to the left along PC-1; while water-Nori, ethanol-Nori and ethanol-Wakame, showing the lowest inhibition enzyme activities, were located on the opposite side of the PC-1. Summarizing, the PCA scatter plot provides the following associations: For water-Sea spaghetti, the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity together with the high glucose diffusion seemed related to its relative SDF and SPP high contents. For ethanol-Sea spaghetti and water-Wakame, the low glucose diffusion and low inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity appeared related to a lower SDF and SPP contents. Finally, for ethanol-Wakame, ethanol-Nori and water-Nori, the high glucose diffusion and the low inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity seemed related to low contents in soluble bioactive compounds.

Figure 4 suggests a high correlation between the two soluble compounds, SDF and SPP, and the inhibition of the glucosidase activity both at medium and final incubation time. No significant correlations were found between glucose diffusion activity through the membrane and the compounds analysed.

## Discussion

Although algal extracts are thought to exert potential antidiabetic effects through inhibiting carbohydrate-digestive enzymes and/or delaying glucose absorption, the topic remains controversial and understudied. The present study indicated that algal extracts affected both  $\alpha$ -glucosidase activity and glucose diffusion but via different and independent mechanism.

As previously commented, the three algae tested differed qualitatively and quantitatively in composition (e.g. total fibre, SDF, polyphenols and mineral contents) [11]. Sea spaghetti is a brown seaweed richer in SDF and uronic acids but has a low-medium mineral content, presenting higher oil retention and swelling capacities [24]. On the contrary, Wakame contains lower SDF but higher mineral content, and exhibits a high water

retention capacity [18]. Nori (red seaweed) displays intermedium values for polyphenols, ash, SDF and oil retention capacity but the highest protein content and the lowest swelling and water retention capacities [18]. Thus, differences in the effects of these algal extracts on carbohydrate digestion and glucose movement through dialysis membrane would be discussed in relation to algal composition.

Phenolic compounds are commonly found in plants and have been reported to have several biological activities. Polyphenols from edible seaweeds have been suggested to influence responses relevant to diabetes through modulation of glucose-induced oxidative stress [25], as well as through inhibition of starch-digestive enzymes [26]. Indeed, polyphenol-rich extracts from *Ascophyllum* inhibited glucosidase and showed promising antidiabetic effects in mouse models [27] and polyphenols from *Ecklonia* have shown positive effects on genetically diabetic mice [3]. There is not sufficient information yet either on individual phenols in algae or on their physiological function in the human organism.

Several authors detected higher amounts of polyphenols in brown than in red and green algae [28]. Phenolic compounds are generally more soluble in polar solvents. The major active compounds in different seaweed extracts have been reported to be phlorotannins and fucoxanthin [29]. Ethanol extracts from brown algae showed higher polyphenol contents than green algae [30]. Brown algae had a total phenol content of 5-45mg GAE/g dry matter. In our study, Sea spaghetti extracts showed the highest polyphenol content. The differences between the phenolic compounds in water and ethanol extracts reflects, at least in part, the polarity of the same and the extent to which they can be esterified and/or glycosylated. The lower amount of phenolic compounds in chloroform extracts seems due to the lower polarity of this solvent in comparison to water and ethanol. These results are in line with those of Moller et al. [31] who unexpectedly found a higher amount of phenolic compounds in the water extract of dittany (*Origanum dictamnus*) as compared to those ones obtained with organic solvents. Ethanolic and water extracts are the most widely employed due to their more hygienic characteristics [32].

Intestinal  $\alpha$ -glucosidase plays an important role in carbohydrate digestion and its inhibition is considered a suitable strategy for treating postprandial hyperglycemia, frequently associated with T2DM. Present results suggest that chloroform extracts displayed, among the extracts assayed, the lowest correlation among studied variables with the  $\alpha$ -glucosidase activity inhibition (data not shown). Preliminary PCA results (data not shown) indicated that plots for chloroform extracts were centred thus indicative of their low effect. Therefore, in the final PCA study only water and ethanol extracts were considered. Clearly, water-Sea spaghetti, could be used as antidiabetic agent since these extracts induced the maximum  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. PCA analysis indicated that SDF and SPP are the most likely candidates for inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activity (Figure 4). Sea



spaghetti is much richer in polyphenols than the other two algae (Table 1), explaining, at least in part, the present results. Several studies have determined that the antidiabetic properties of algae are mostly due to the effects of some polyphenols on carbohydrate digestion. Among brown algae, polyphenols (i.e. phlorotannins) present in alcoholic extracts, have been found to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity. Phlorotannins in general [33] and particularly those isolated from *Ascophyllum nodosum* have shown potential antidiabetic effects through the inhibition of both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes [34]. Methanolic extracts of *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*, and their isolated phlorotannins are potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. Molecular size and number of hydroxyl groups were crucial for the grade/intensity of this inhibition [35]. Methanolic extracts of *Ecklonia stolonifera*, rich in phlorotannins, show stronger  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity than water extracts, and contain more polyphenols [3]. Phloroglucinol from *Ecklonia cava* showed  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities [26].

The influence of SDF on inhibition of starch digestive enzymes at a very low level and maintenance of the *in vivo* glycemic control has been suggested [36]. The hypoglycemic properties of fibre polysaccharides from Sea spaghetti were demonstrated in rabbits by Lamela et al. [37]. Sea spaghetti is rich in SDF, and its fucoidans, rich in glucuronic acid, have a similar structure to fucoidans of *Ascophyllum*, which present a known  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity [38]. *Fucus vesiculosus* showed inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity that correlated with phenolic contents [36]. Furthermore, the interaction between SDF and SPP should not be discarded, as these types of compounds are often associated in seaweeds [9]. Wakame, although is a brown seaweed, presented lower amount of SDF, composed essentially by alginates [39], and its fucoidans structure is quite different from those of Sea spaghetti [38]. The ineffectiveness of Wakame polysaccharides as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors was shown by Cho et al. [40], who observed that they only had inhibitory effect when sulphonation degree increased. Moreover, aqueous extracts should contain both compounds (fucoidans and polyphenols), being much richer the aqueous extracts from Sea spaghetti than those from the other two algae, explaining our present results on  $\alpha$ -glucosidase inhibition.

Among possible mechanisms related with the antihyperglycemic action of seaweed, the decrease in glucose absorption should be emphasised. Seaweed extracts inhibit glucose movement dealing with viscosity of the plant extract and soluble polysaccharides, as glucose absorption is intimately related to gastric emptying and time inhibition [41]. Previous reports show the effect of seaweed extracts on glucose absorption models [15]. However, to the best of our knowledge this is the first report investigating extracts of Sea spaghetti. The extracts distinctly modified the movement of glucose across membrane. Comparing slope adjustments of all extracts

301 assayed, ethanol-Sea spaghetti and water-Wakame demonstrated the highest inhibitory effects on glucose  
302 diffusion compared with control; while water-Sea spaghetti increased the trend diffusion. Interestingly, during  
303 the first hour all extracts, except for that of ethanol-Sea spaghetti, increased glucose diffusion through  
304 membrane. No hypothesis is available at present to explain this short-term effect.

305 Coinciding with the lower glucose absorption trends, ethanol-Sea spaghetti and water-Wakame showed the  
306 lowest AUC for glucose. Thus, it can be suggested the potential utility to promote decreases of glucose diffusion  
307 in terms of trend and intensity of both previously cited extracts.

308 Present results suggest that chloroform extracts displayed, among the extracts assayed, the lowest effects in  
309 glucose diffusion activity. As in the case of the  $\alpha$ -glucosidase inhibition analysis, preliminary PCA results (data  
310 not shown) indicated that plots for chloroform extracts at final time were almost centred; thus, indicative of  
311 their lower effect on glucose diffusion. Therefore, in the final PCA study performed only water and ethanol  
312 extracts were considered. However, no clear association was found in the PCA between major compound  
313 composition and glucose diffusion (Figures 3 and 4). As Wakame was richer in alginate [39], and Sea spaghetti  
314 in polyphenols [11], alginates in the water-Wakame and polyphenols in the ethanol-Sea spaghetti seemed the  
315 potential candidates to exert inhibition on glucose diffusion. However, the type and total concentration of  
316 polyphenols and other compounds (e.g. alginates) or even their time-course effects did not overlap, explaining  
317 the absence of concurrence in the PCA. Several reports suggest the glucose absorption delay promoted by  
318 alginates. Thus, it has been demonstrated that alginates act on glucose absorption and insulin response in non-  
319 diabetic [42] and T2DM patients [43]. Moreover, methanolic extracts from *Ecklonia stolonifera*, rich in  
320 phlorotannins [3], suppressed the increase of plasma glucose levels in diabetic kk-A mice, emphasizing the  
321 contribution of polyphenols and alginates to our hypothesis. Future studies will be addressed to determine the  
322 concentration of specific polyphenols or alginates involved.

323 In summary, the present study suggests that the particular solvent used to extract the seaweed material will  
324 have a dramatic effect on the hypoglycemic activity [44]. Thus, future studies should be conducted to ascertain  
325 which specific active compounds are mainly responsible for the effects observed and to address the best way to  
326 isolate them. According to present results, ethanol and water extracts of Sea spaghetti, and water extracts of  
327 Wakame could be useful for the development of functional foods with specific hypoglycemic properties. Since  
328 the effects of seaweed extracts on glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity do not coincide, the alga  
329 antidiabetic/hypoglycemic effects should be viewed as simplistic, and studies to discover the source of their  
330 activity need to be conducted.

331

332 **Abbreviations:** AGF,  $\alpha$ -glucosidase activity at final time; AGM,  $\alpha$ -glucosidase activity at medium time; GAE,  
333 gallic acid equivalents; GDF, glucose concentration at final time; GDM glucose concentration at medium time;  
334 IGDM, inhibition percentage of glucose diffusion at medium time; IAGM, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity at  
335 medium time; IAGF, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity at final time; IGDF, inhibition percentage of glucose  
336 diffusion at final time; PC-1, PC-2, and PC-3, First, second and third principal components; PCA, principal  
337 component analysis; SPP, soluble polyphenols; SDF, soluble dietary fibre.

338

#### 339 **Competing interests**

340 The authors declare that they have no competing interests.

341

342 **Acknowledgements** The study was granted by the Spanish project AGL-2011 25644-C02-02 and by  
343 Consolider-Ingenio 2010 project reference CSD2007-00016. We acknowledge the predoctoral fellowship of  
344 Universidad Complutense, Madrid, Spain to Adriana Schultz, and their predoctoral short scientific stay at  
345 Queen's University of Belfast.

346

#### 347 **Authors' contributions**

348 All authors have significantly contributed to the paper. JB is the corresponding author and Guarantor of the  
349 paper and with FJSM have contributed to the study design, data discussion and writing of the paper. ARSM, AG,  
350 and SB have contributed to the data acquisition and analysis and writing of the paper. BDG and ER have  
351 contributed to analysis and critically reviewed the manuscript. AJE has contributed to data acquisition by PCA  
352 model and to data discussion and writing of the paper. PR has contributed to data discussion and made a critical  
353 review of the manuscript draft. All authors have read and approved of the final manuscript.

354

#### 355 **References**

- 356 1. Gil B, Maldonado A, Soto JA, Gómez Jiménez F J: **Hiperglucemia postprandial como factor de riesgo**  
357 **cardiovascular**. *Rev Clin Esp* 2002, **202** (7): 399-402.
- 358 2. Hwang H, Kim I, Nam T: **Polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens* stimulate the growth of**  
359 **gastrointestinal cells**. In: *Marine medicinal foods: Implications and applications, macro and microalgae*.  
360 Edited by SK Kim. Advances in Food & Nutrition Research, New York: Academic Press; 2011: 179-190.

- 361 3. Iwai K: **Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in**  
 362 **genetically diabetic KK-A(y) mice.** *Plant Foods Hum Nutr* 2008, **63** (4): 163-169.
- 363 4. Kumar RV, Sinha VR: **Newer insights into the drug delivery approaches of 354  $\alpha$ -glucosidase inhibitors.**  
 364 *Expert Opin Drug Deliv* 2012, **9** (4): 403-416.
- 365 5. Anderson JW, Randles KM, Kendall CW, Jenkins DJ: **Carbohydrate and fiber recommendations for**  
 366 **individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta-analysis of the evidence.** *J Am Coll Nutr*  
 367 2004, **23** (1): 5-17.
- 368 6. Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, Dettmar PW, Havler ME, Atherton MR, Onsoyen E: **Alginate as a source**  
 369 **of dietary fiber.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005, **45** (6): 497-510.
- 370 7. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Rodenas S, Sánchez-Muniz FJ: **Characteristics and nutritional and**  
 371 **cardiovascular-health properties of seaweeds.** *J Med Food* 2009, **12** (2): 236-258.
- 372 8. Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G: **Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed**  
 373 **products.** *Food Chem* 2007, **103**(3): 891-899
- 374 9. Jiménez-Escrig A, Sanchez Muniz FJ: **Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure,**  
 375 **physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism.** *Nutr Res* 2000, **20** (4): 585-598.
- 376 10. Maeda H, Hosokawa M, Sashima, T, Funayama K, Miyashita K: **Fucoxanthin from edible seaweed,**  
 377 ***Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissue.** *Biochem*  
 378 *Biophys Res Commun* 2005, **332** (2): 392-397.
- 379 11. Cofrades S, López-López I, Bravo L, Ruiz-Capillas C, Bastida S, Larrea MT, Jimenez-Colmenero F:  
 380 **Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds.** *Food Sci*  
 381 *Technol Int* 2010, **16** (5): 361-370.
- 382 12. Olivero David R, Schultz-Moreira A, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J,  
 383 Sanchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ: **Effects of Nori- and Wakame-enriched meat**  
 384 **with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia, and lipoproteinaemia in**  
 385 **growing Wistar rats.** *Br J Nutr* 2011, **106** (10): 1476-1486.
- 386 13. Schultz Moreira A., Benedí J, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus MI, González-  
 387 Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ: **Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia***  
 388 ***elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and**  
 389 **expression in growing rats.** *Food Chem* 2011, **129** (4): 1623-1630.

- 390 14. Mortensen A, Sorensen IK, Wilde C, Dragoni S, Mullerová D, Toussaint O, Zloch Z, Sgaragli G, Ovesna J:  
 391 **Biological models for phytochemical research: from cell to human organism.** *Br J Nutr* 2008, **99** (suppl. 1):  
 392 ES118-ES126.
- 393 15. Gallagher AM, Flatt PR, Duffy G, Abdel-Wahab Y: **The effects of traditional antidiabetic plants on *in***  
 394 ***vitro* glucose diffusion.** *Nutr Res* 2003, **23** (3): 413-424.
- 395 16. Jo SH, Lee HS, Apostolidis E, Jang HD, Kwon YI: **Comparison of antioxidant potential and rat intestinal**  
 396  **$\alpha$ -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin.** *Int J Appl Res Nat Prod* 2009, **2** (4):  
 397 52-60.
- 398 17. Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Rupérez P: **Brown and red seaweeds as potential sources of**  
 399 **antioxidant nutraceuticals.** *J Appl Phycol* 2012, **24** (5): 1123-1132.
- 400 18. Rupérez P, Saura-Calixto F: **Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds.**  
 401 *Eur Food Res Technol* 2001, **212** (3): 349-354.
- 402 19. Gerasimenko NI, Chaykina EL, Busarova NG, Anisimov MM: **Antimicrobial and hemolytic activity of**  
 403 **low-molecular metabolites of brown seaweed *Laminaria cichorioides* (Miyabe).** *Appl Biochem Microbiol*  
 404 2010, **46** (4): 426-430.
- 405 20. Shojaee-Aliabadi S, Hosseini SM, Tiwari B, Hashemi M, Fadavi G, Khaksar R: **Polyphenols content and**  
 406 **antioxidant activity of Ghure (unripe grape) marc extract: Influence of extraction time, temperature and**  
 407 **solvent type.** *Int J Food Sci Technol* 2013, **48** (2): 412-418.
- 408 21. Gray AM, Flatt PR: **Actions of the traditional anti-diabetic plant, *Agrimony eupatoria* (agrimony):**  
 409 **effects on hyperglycaemia, cellular glucose metabolism and insulin secretion.** *Br J Nutr* 1998, **80** (1): 109-  
 410 114.
- 411 22. Taga MS, Miller EE, Pratt DE: **Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants.** *J Am Oil Chem Soc*  
 412 1984, **61**(5): 928-931.
- 413 23. Mai TT, Thu NN, Tien PG, Van Chuyen N: **Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of**  
 414 **Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents.** *J Nutr Sci Vitaminol* 2007, **53**  
 415 (3): 267-276.
- 416 24. Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P: **Dietary fibre and physicochemical properties of**  
 417 **several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast.** *Food Res Int* 2010, **43** (9): 2289-2294.

- 418 25. Lee SH, Han JS, Heo SJ, Hwang JY, Jeon,YJ: **Protective effects of dieckol isolated form *Ecklonia cava***  
 419 **against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical endothelial cells.** *Toxicol In Vitro* 2010, 24  
 420 (2): 375–381.
- 421 26. Lee SH, Li Y, Karadeniz F, Kim M.M, Kim S:  **$\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of**  
 422 **phloroglucinol derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*.** *J Sci Food Agric* 2009, 89 (9):  
 423 1552–1558.
- 424 27. Zhang J, Tiller C, Shen J, Wang C, Giroraud GS, Dennis D, Barrow CJ, Miao CJ, Ewart HS: **Antidiabetic**  
 425 **properties of polysaccharide- and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum***  
 426 ***nodosum*.** *Can J Physiol Pharmacol* 2007, 85 (11): 1115–1123.
- 427 28. Devi GK, Manivannan K, Thirumanan G, Rajathi FA, Anantharaman P: **In vitro antioxidant activities of**  
 428 **selected seaweeds from Southeast coast of India.** *Asian Pac J trop Med* 2011, 4 (3):205-211.
- 429 29. Yan XJ, Chuda Y Suzuki M, Nagata, T: **Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a**  
 430 **common edible seaweed.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1999, 63 (3): 605–607.
- 431 30. Gunji S, Santoso J, Yoshie-Stark Y, Suzuki T: **Effects of extracts from tropical seaweeds on DPPH**  
 432 **radicals and Caco-2 cells treated with hydrogen peroxide.** *Food Sci Technol Res* 2007, 13:275-279.
- 433 31. Moller JKS, Madsen HL, Aaltonen T, Skibsted LH: **Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-**  
 434 **extractable antioxidants.** *Food Chem* 1999, 64 (2): 215-219.
- 435 32. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC: **Review:**  
 436 **Natural antioxidants from residual sources.** *Food Chem* 200, 72 (2): 145-171.
- 437 33. Thomas VN, Kim S: **Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine**  
 438 **brown algae.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2011, 32 (3): 325–335.
- 439 34. Nwosu F, Morris J, Lund VA, Stewart D, Ross HA., McDougall GJ: **Anti-proliferative and potential**  
 440 **antidiabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae.** *Food Chem* 2011, 126 (3): 1006–  
 441 1012.
- 442 35. Moon HE, Islam N, Ahn BR, Chowdhury SS, Sohn HS, Jung HA, Choi JS: **Protein Tyrosine Phosphatase**  
 443 **1B and  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory phlorotannins from edible Brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia***  
 444 ***bicyclis*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2011, 75 (8): 1472-1480.
- 445 36. Kim KT: **Seasonal variation of seaweed components and novel biological function of fucoidan extracted**  
 446 **from brown algae in Quebec.** *PhD Thesis.* Quebec, Canada, 2012.

- 447 37. Lamela M, Anca J, Villar R, Otero J, Calleja M: **Hypoglycemic activity of several seaweed extract.** *J*  
 448 *Ethnopharmacol* 1989, **27**(1-2): 35-43.
- 449 38. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R: **Fucoidan: Structure and Bioactivity.** *Molecules* 2008, **13** (8): 1671-1695.
- 450 39. Ikeda K, Kitamura A, Machida H, Watanabe M, Negishi H, Hiraoka J, Nakano T: **Effect of *Undaria***  
 451 ***pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously**  
 452 **hypertensive rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003, **30** (1-2): 44-48.
- 453 40. Cho M, Han JH, You S: **Inhibitory effects of fucan sulfates on enzymatic hydrolysis of starch.** *LWT -*  
 454 *Food Sci Technol* 2011, **44** (4): 1164-1171.
- 455 41. Jenkins DJ, Kendall CW, Alexen M, Augustin LS, Vuksan V: **Viscous and nonviscous fibres,**  
 456 **nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease.** *Curr*  
 457 *Opin Lipidol* 2000, **11** (1): 49-56.
- 458 42. Wolf BW, Lai C, Kipnes MS, Ataya DG, Wheeler KB, Zinker BA, Garbec Ka, Firkins JL: **Glycemic and**  
 459 **insulinemic responses of nondiabetic healthy adult subjects to an experimental acid-induced viscosity**  
 460 **complex incorporated into a glucose beverage.** *Nutrition* 2002, **18** (7-8): 621-626.
- 461 43. Torsdottir I, Alpsten M, Holm G, Sandberg AS, Tolli JA: **A small dose of soluble alginate-fibre affects**  
 462 **postprandial glycemia and gastric emptying in humans with diabetes.** *J Nutr* 1991, **121** (6): 795-799.
- 463 44. Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S: **An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six**  
 464 **species of edible Irish seaweeds.** *Int Food Res* 2010, **17**: 205-220.



**Table 1.** Composition, dietary fibre, and selected physico-chemical properties of Nori, Wakame and Sea spaghetti.

	Nori	Wakame	Sea spaghetti
Ash (g/100g dm)	12 <sup>1</sup>	37 <sup>1</sup>	30 <sup>1</sup>
Protein (g/100g dm)	36.5 <sup>1</sup>	11.2 <sup>1</sup>	4.8 <sup>1</sup>
Total fibre (g/100g dm)	37 <sup>1</sup>	42 <sup>1</sup>	51 <sup>1</sup>
Soluble fibre (g/100g dm)	22 <sup>1</sup>	14 <sup>1</sup>	25 <sup>1</sup>
Swelling capacity (mL/g dm)	6.08 <sup>2</sup>	10.53 <sup>2</sup>	10.97 <sup>3</sup>
Water retention capacity (g/g dm)	5.12 <sup>2</sup>	10.96 <sup>2</sup>	7.26 <sup>3</sup>
Oil retention capacity (g/g dm)	1.04 <sup>2</sup>	0.96 <sup>2</sup>	1.61 <sup>3</sup>

dm, dry matter <sup>1</sup> Cofrades et al. [11]; <sup>2</sup> Rupérez and Saura-Calixto [18]; <sup>3</sup> Gómez-Ordóñez et al. [24].

**Table 2.** Total phenolic content (mg gallic acid equivalents/g extract) of water, ethanol and chloroform extracts from Nori, Wakame and Sea spaghetti

Seaweeds	Water extracts	Ethanol extracts	Chloroform extracts
Nori	4.41 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.43±1.02 <sup>a</sup>	3.21±1.12 <sup>a</sup>
Wakame	11.12 ± 1.13 <sup>b</sup>	25.12±1.34 <sup>b</sup>	7.24±0.78 <sup>b</sup>
Sea spaghetti	18.45 ± 2.04 <sup>c</sup>	34.43 ± 2.11 <sup>c</sup>	11.56±1.24 <sup>c</sup>

All the values are mean ± SD of three determinations. Different superscript letters within the same column indicate significant differences between samples at the level of  $P < 0.05$

**Table 3.** Effect of chloroform, ethanol, and water extracts from Nori, Wakame and Sea spaghetti on  $\alpha$ -glucosidase activity *in vitro*<sup>1</sup>

Time (min)	15	30	45	60	75
Blank control	1.3±0.2 <sup>b</sup>	2.5±0.05 <sup>c</sup>	5.5±0.3 <sup>c</sup>	7.7±0.3 <sup>ab</sup>	9.2±0.4 <sup>a</sup>
Ch-Nori	1.8±0.1 <sup>abc</sup>	3.9±0.5 <sup>b</sup>	6.1±0.2 <sup>abc</sup>	7.6±0.5 <sup>ab</sup>	9.4±0.4 <sup>a</sup>
Ch-Wakame	1.5±0.4 <sup>bc</sup>	3.5±0.2 <sup>b</sup>	6.1±0.3 <sup>abc</sup>	7.3±0.0 <sup>b</sup>	9.3±0.4 <sup>a</sup>
Ch-Sea spaghetti	2.2±0.1 <sup>a</sup>	4.4±0.2 <sup>a</sup>	6.4±0.2 <sup>b</sup>	8.2±0.3 <sup>a</sup>	9.7±0.1 <sup>a</sup>
Acarbose	0.2±0.1 <sup>d</sup>	1.5±0.1 <sup>d</sup>	1.2±0.2 <sup>d</sup>	0.8±0.3 <sup>c</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>
ANOVA	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Blank control	1.6±0.2 <sup>b</sup>	2.9±0.5 <sup>ab</sup>	5.7±0.0 <sup>ab</sup>	7.7±0.4 <sup>b</sup>	9.4±0.0 <sup>a</sup>
Eth-Nori	2.1±0.2 <sup>a</sup>	3.5±0.90 <sup>a</sup>	6.0±0.3 <sup>a</sup>	8.8±0.0 <sup>a</sup>	10.1±0.9 <sup>a</sup>
Eth-Wakame	1.4±0.3 <sup>b</sup>	3.6±0.3 <sup>a</sup>	5.1±0.1 <sup>ab</sup>	8.1±0.1 <sup>b</sup>	10.0±0.3 <sup>a</sup>
Eth-Sea spaghetti	2.1±0.1 <sup>a</sup>	4.0±0.2 <sup>a</sup>	6.7±0.1 <sup>a</sup>	8.5±0.3 <sup>ab</sup>	10.4±0.05 <sup>a</sup>
Acarbose	0.3±0.0 <sup>c</sup>	0.9±0.2 <sup>c</sup>	1.0±0.4 <sup>c</sup>	0.5±0.2 <sup>c</sup>	0.8±0.0 <sup>b</sup>
ANOVA	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Blank control	1.1±0.2 <sup>b</sup>	3.3±0.1 <sup>b</sup>	4.0±1.4 <sup>b</sup>	7.0±0.2 <sup>a</sup>	8.7±0.0 <sup>a</sup>
W-Nori	1.7±0.1 <sup>a</sup>	4.0±0.2 <sup>a</sup>	6.4±0.1 <sup>a</sup>	8.2±0.2 <sup>a</sup>	10.4±0.3 <sup>b</sup>
W-Wakame	1.7±0.1 <sup>a</sup>	3.9±0.0 <sup>a</sup>	5.7±0.0 <sup>ab</sup>	8.3±0.0 <sup>a</sup>	9.4±0.5 <sup>ab</sup>
W-Sea spaghetti	1.3±0.4 <sup>b</sup>	1.7±0.3 <sup>c</sup>	2.2±0.2 <sup>c</sup>	2.7±0.9 <sup>b</sup>	3.3±0.6 <sup>c</sup>
Acarbose	0.7±0.3 <sup>c</sup>	1.0±0.1 <sup>d</sup>	1.6±0.2 <sup>c</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>d</sup>
ANOVA	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>1</sup> Determined as glucose released (mmol/L glucose) from maltose. Mean  $\pm$  SD of three determinations. Values within a column with unlike superscript letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Ch, chloroform; Eth, ethanol; W, Water.

**Table 4.** Effects of chloroform, ethanol, and water extracts from Nori, Wakame and Sea spaghetti on glucose diffusion *in vitro*.

Time (min)	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Blank control	1.4±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	2.7±1.2 <sup>a</sup>	3.7±0.2 <sup>a</sup>	4.1±0.1 <sup>ab</sup>	4.5±0.1 <sup>b</sup>	4.9±0.3 <sup>c</sup>	5.5±0.2 <sup>d</sup>	6.2±0.2 <sup>c</sup>	6.7±0.1 <sup>c</sup>	7.9±0.3 <sup>a</sup>	8.8±0.3 <sup>a</sup>
Ch-Nori	2.0±0.1 <sup>a</sup>	1.9±0.3 <sup>c</sup>	2.7±0.2 <sup>a</sup>	4.3±0.6 <sup>a</sup>	5.0±0.1 <sup>a</sup>	5.4±0.2 <sup>a</sup>	5.9±0.1 <sup>b</sup>	5.9±0.0 <sup>c</sup>	6.1±0.1 <sup>c</sup>	6.5±0.1 <sup>d</sup>	6.7±0.2 <sup>b</sup>	6.9±0.1 <sup>b</sup>
Ch-Wakame	2.2±0.1 <sup>a</sup>	3.5±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.1 <sup>a</sup>	4.7±0.3 <sup>a</sup>	5.0±0.2 <sup>a</sup>	5.5±0.2 <sup>a</sup>	6.6±0.1 <sup>a</sup>	6.9±0.1 <sup>a</sup>	7.2±0.2 <sup>a</sup>	7.6±0.1 <sup>a</sup>	8.1±0.2 <sup>a</sup>	8.4±0.3 <sup>a</sup>
Ch-Sea spaghetti	2.1±0.1 <sup>a</sup>	2.7±0.1 <sup>b</sup>	3.6±0.2 <sup>a</sup>	4.4±0.0 <sup>a</sup>	3.3±1.2 <sup>b</sup>	4.6±0.1 <sup>b</sup>	5.3±0.3 <sup>bc</sup>	6.5±0.2 <sup>b</sup>	6.7±0.1 <sup>b</sup>	7.1±0.1 <sup>b</sup>	7.7±0.1 <sup>a</sup>	8.8±0.1 <sup>a</sup>
ANOVA	<0.001	<0.001	0.041	0.046	0.019	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Blank control	1.4±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	2.7±1.2 <sup>a</sup>	3.7±0.2 <sup>a</sup>	4.1±0.1 <sup>ab</sup>	4.5±0.1 <sup>b</sup>	4.9±0.3 <sup>c</sup>	5.5±0.2 <sup>d</sup>	6.2±0.2 <sup>c</sup>	6.7±0.1 <sup>c</sup>	7.9±0.3 <sup>a</sup>	8.8±0.3 <sup>a</sup>
Eth-Nori	1.7±0.1 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	3.1±0.6 <sup>a</sup>	2.5±0.9 <sup>ab</sup>	1.7±0.1 <sup>b</sup>	3.9±0.1 <sup>b</sup>	4.1±0.1 <sup>b</sup>	4.6±0.1 <sup>b</sup>	5.2±0.2 <sup>b</sup>	5.5±0.1 <sup>c</sup>	6.3±0.1 <sup>b</sup>	7.0±0.1 <sup>b</sup>
Eth-Wakame	1.75±0.1 <sup>a</sup>	2.2±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.0 <sup>a</sup>	3.3±0.2 <sup>a</sup>	4.0±0.1 <sup>a</sup>	4.7±0.1 <sup>a</sup>	5.1±0.1 <sup>a</sup>	5.4±0.15 <sup>a</sup>	5.9±0.5 <sup>a</sup>	6.2±0.2 <sup>b</sup>	7.7±0.2 <sup>a</sup>	8.6±0.1 <sup>a</sup>
Eth-Sea spaghetti	1.0±0.1 <sup>c</sup>	1.1±0.1 <sup>d</sup>	1.3±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.2 <sup>b</sup>	1.7±0.1 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>c</sup>	2.3±0.1 <sup>c</sup>	2.4±0.1 <sup>c</sup>	2.5±0.1 <sup>c</sup>	2.7±0.1 <sup>d</sup>	2.7±0.1 <sup>c</sup>	3.1±0.1 <sup>c</sup>
ANOVA	<0.001	<0.001	0.036	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Blank control	1.4±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	2.7±1.2 <sup>b</sup>	3.7±0.2 <sup>bc</sup>	4.1±0.1 <sup>ab</sup>	4.5±0.1 <sup>b</sup>	4.9±0.3 <sup>c</sup>	5.5±0.2 <sup>b</sup>	6.2±0.2 <sup>c</sup>	6.7±0.1 <sup>c</sup>	7.9±0.3 <sup>a</sup>	8.8±0.3 <sup>a</sup>
W-Nori	2.4±0.4 <sup>a</sup>	3.0±0.1 <sup>b</sup>	3.5±0.5 <sup>b</sup>	4.2±0.1 <sup>b</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	3.9±0.1 <sup>c</sup>	4.3±0.3 <sup>c</sup>	4.6±0.1 <sup>c</sup>	5.2±0.1 <sup>c</sup>	5.6±0.1 <sup>c</sup>	6.8±0.1 <sup>c</sup>	7.7±0.3 <sup>b</sup>
W-Wakame	1.7±0.3 <sup>b</sup>	1.8±0.1 <sup>c</sup>	2.0±0.1 <sup>b</sup>	2.8±0.8 <sup>c</sup>	2.5±0.7 <sup>c</sup>	1.8±0.1 <sup>d</sup>	2.0±0.1 <sup>d</sup>	2.3±0.1 <sup>d</sup>	2.7±0.1 <sup>d</sup>	2.9±0.1 <sup>d</sup>	3.1±0.1 <sup>d</sup>	3.6±0.1 <sup>c</sup>
W-Sea spaghetti	1.7±0.1 <sup>bc</sup>	4.6±1.0 <sup>a</sup>	6.1±0.5 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	7.7±0.3 <sup>a</sup>	8.0±0.1 <sup>a</sup>	8.3±0.2 <sup>a</sup>	8.6±0.1 <sup>a</sup>	9.1±0.1 <sup>a</sup>	9.5±0.1 <sup>a</sup>	10.6±0.1 <sup>a</sup>	11.8±0.8 <sup>a</sup>
ANOVA	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Mean (mmol/L glucose) ± SD of three determinations. Values in the same column bearing different small letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Ch, chloroform; Eth, ethanol; W,

Water

**Table 5.** Linear regressions of glucose diffusion rate (mmol/L/min) by chloroform, ethanol and water extracts from Nori, Wakame and Sea spaghetti

Linear regression	Intercept $\pm$ SE	Slope $\pm$ SE	R <sup>2</sup> ; ( $\beta$ -coefficient)	P	ANCOVA*
Blank control	0.449 $\pm$ 0.190	0.022 $\pm$ 0.001	0.962; (0.981)	<0.001	Nori vs. blank control ( $p = 0.036$ )
Ch-Nori	1.342 $\pm$ 0.280	0.018 $\pm$ 0.001	0.882; (0.939)	<0.001	
Ch-Wakame	1.699 $\pm$ 0.251	0.020 $\pm$ 0.001	0.924; (0.961)	<0.001	Wakame vs. Nori ( $p = 0.040$ )
Ch-Sea spaghetti	1.067 $\pm$ 0.244	0.021 $\pm$ 0.001	0.932; (0.965)	<0.001	
Blank control	0.449 $\pm$ 0.190	0.022 $\pm$ 0.001	0.962; (0.981)	<0.001	Nori vs. blank control ( $p < 0.001$ );
Eth-Nori	0.570 $\pm$ 0.243	0.017 $\pm$ 0.001	0.902; (0.950)	<0.001	Sea Spaghetti vs. blank control ( $p < 0.001$ );
Eth-Wakame	0.752 $\pm$ 0.157	0.020 $\pm$ 0.001	0.969; (0.985)	<0.001	Wakame vs. Nori ( $p < 0.001$ );
Eth-Sea spaghetti	0.506 $\pm$ 0.077	0.007 $\pm$ 0.000	0.946; (0.972)	<0.001	Wakame vs. Sea Spaghetti ( $p < 0.001$ );
Blank control	0.449 $\pm$ 0.190	0.022 $\pm$ 0.001	0.962; (0.981)	<0.001	Nori vs. Sea Spaghetti ( $p < 0.001$ )
W-Nori	1.430 $\pm$ 0.266	0.015 $\pm$ 0.001	0.864; (0.930)	<0.001	Wakame vs. blank control ( $p < 0.001$ );
W-Wakame	1.105 $\pm$ 0.221	0.006 $\pm$ 0.001	0.592; (0.769)	<0.001	Nori vs. blank control ( $p = 0.018$ );
W-Sea spaghetti	2.403 $\pm$ 0.498	0.027 $\pm$ 0.002	0.844; (0.919)	<0.001	Wakame vs. Nori ( $p < 0.001$ );
					Wakame vs. Sea Spaghetti ( $p < 0.001$ );
					Nori vs. Sea Spaghetti ( $p < 0.001$ )

P: linear adjustment significance; p: differences between linear adjustments \*Only significant differences shown. Ch, chloroform; Eth, ethanol; W, Water

**Table 6.** Rotated component matrix for the analysis of the relation between bioactive compounds in water and ethanol extracts from Nori, Wakame and Sea spaghetti on glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase assays

Variable	PC 1	PC 2	PC 3
Soluble Fibre	-0.036	0.149	0.983
Soluble Polyphenols	-0.535	-0.221	0.790
Ash	0.399	0.110	-0.903
Protein	0.756	0.505	-0.026
Diffusion Assay			
GDM	-0.612	0.749	0.230
GDF	0.612	-0.749	-0.230
% IGDM	-0.113	0.971	-0.109
% IGDF	0.124	-0.971	0.104
Enzymatic Assay			
AGM	0.905	-0.275	-0.239
AGF	-0.905	0.275	0.239
% IAGM	0.896	-0.311	-0.288
% IAGF	-0.896	0.311	0.288

Factors were extracted with the principal component analysis using the Varimax rotation. PC, principal component; AGF,  $\alpha$ -glucosidase activity at final time (determination at 90 min); AGM,  $\alpha$ -glucosidase activity at medium time (determination at 45 min); GDF, glucose concentration at final time (determination at 360 min); GDM glucose concentration at medium time (determination at 180 min); %IGDM, inhibition percentage of glucose diffusion at 180 min; %IAGM, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity at 45 min; %IAGF, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity at 90 min; %IGDF, inhibition percentage of glucose diffusion at 360 min.

## 1 **Figure legends**

2 **Figure 1.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibition (%) of water extracts from seaweeds in comparison to blank control at  
3 different experimental times. Bars bearing different letters were significantly different ( $P < 0.05$ , Bonferroni  
4 test). (W-, water extract). Notice that acarbose inhibition was stated at +100% level while negative values mean  
5 an increase of  $\alpha$ -glucosidase activity.

6

7 **Figure 2.** Effect of seaweeds extracts on the Area under the curve (AUC) values for glucose diffusion. **2A.** AUC  
8 value at 180 min. **2B.** AUC values at 360 min. Values for the same type of extracts bearing different letter were  
9 significantly different ( $P < 0.05$ , Bonferroni test). All multiple comparison were significantly different (at least  $P$   
10 = 0.021) according to ANOVA test except for those of chloroform at 180 min (all, non significant).  
11 (Ch-, chloroform extract; Eth-, ethanol extract; W-, water extract)

12

13 **Figure 3.** Principal Component analysis (PCA) scatter tri-plot using twelve variables in the study of the *in vitro*  
14 glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity in ethanol- (Eth-) and water- (W-) extracts from Sea spaghetti (Ss),  
15 Wakame (Wk) and Nori (No) seaweeds. PC-1, PC-2, and PC-3 accounted for 58.5%, 22.9%, and 11.7% of the  
16 variance, respectively. Dot lines at 0 in the PC-1, PC-2 and PC-3 scales means no explanation by the specific PC  
17 to the variability found in each seaweed entity. Notice that chloroform extracts were not included due to their  
18 low effect on the *in vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity studies.

19

20 **Figure 4.** Loading PCA tri-plot for protein (Pr), ash (Ash), soluble polyphenols (SPP), and soluble dietary fibre  
21 (SDF) contents of the three seaweeds which were *in vitro* tested for glucose concentration and inhibition  
22 percentage of glucose diffusion at medium (GDM and IGDM) and final times (GDF and IGDF) and for  $\alpha$ -  
23 glucosidase activity at medium (AGM and IAGM) and final times (AGF and IAGF) on water and ethanol  
24 extracts. Dot lines at 0 in the PC-1, PC-2 and PC-3 scales means no contribution of each variable to the specific  
25 PC. This figure shows the different correlations between the different variables considered taking into account  
26 the three PCA components. Notice that chloroform extracts were not included due to their low effect on the *in*  
27 *vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity studies.

28

29



30 **Alternative legends for Figures 3 and 4 for PCA in 2 dimensions”.**

31 **Figure 3 2D.** Principal Component analysis (PCA) scatter 2 dimension plots (PC-1 & PC2); PC1 & PC-3; and  
32 PC2 & PC-3) using twelve variables in the study of the *in vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity in  
33 ethanol- (Eth-) and water- (W-) extracts from Sea spaghetti (Ss), Wakame (Wk) and Nori (No) seaweeds. PC-1,  
34 PC-2, and PC-3 accounted for 58.5%, 22.9%, and 11.7% of the variance, respectively. Dot lines at 0 in the PC-1,  
35 PC-2 and PC-3 scales means no explanation by the specific PC to the variability found in each seaweed entity.  
36 Notice that chloroform extracts were not included due to their low effect on the *in vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -  
37 glucosidase activity studies.

38

39 **Figure 4 2D.** Loading PCA 2 dimension plot (PC-1 & PC-2) for protein (Pr), ash (Ash), soluble polyphenols  
40 (SPP), and soluble dietary fibre (SDF) contents of the three seaweeds which were *in vitro* tested for glucose  
41 concentration and inhibition percentage of glucose diffusion at medium (GDM and IGDM) and final times (GDF  
42 and IGDF) and for  $\alpha$ -glucosidase activity at medium (AGM and IAGM) and final times (AGF and IAGF) on  
43 water and ethanol extracts. This 2D figure shows information comparable to that observed in the 3D plot,  
44 although the influence of the correlations between variables given by the PC-3 is lost. Lines at 0 in the PC-1 and  
45 PC-2 scales mean no correlations between the different variables considered into the specific PC. Notice that  
46 chloroform extracts were not included due to their low effect on the *in vitro* glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase  
47 activity studies.

48

49

Figure 1

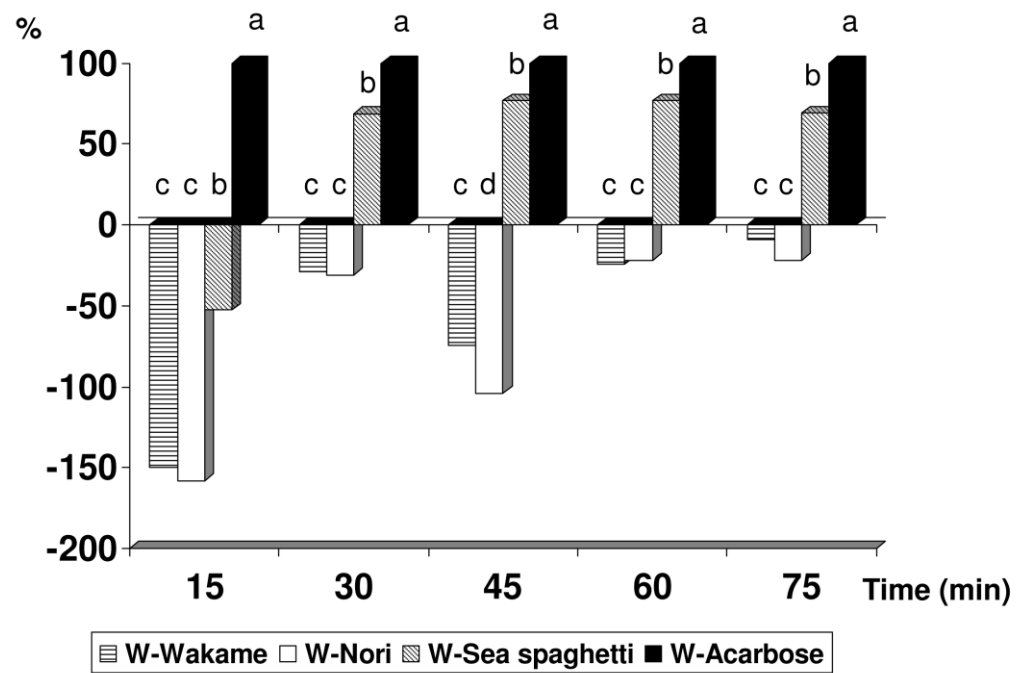


Figure 1

Figure 2

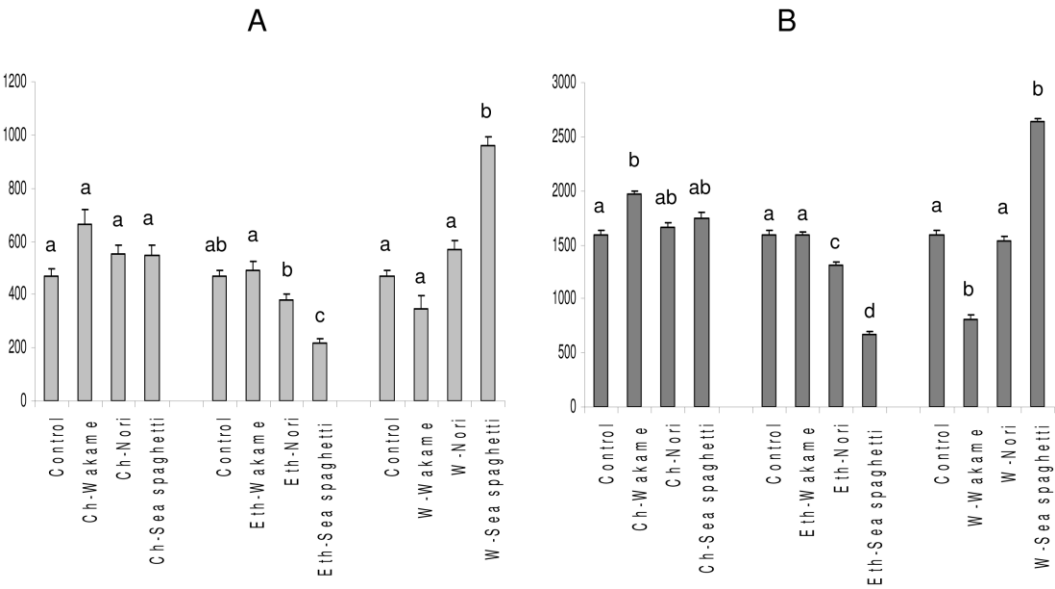


Figure 2

Figure 3

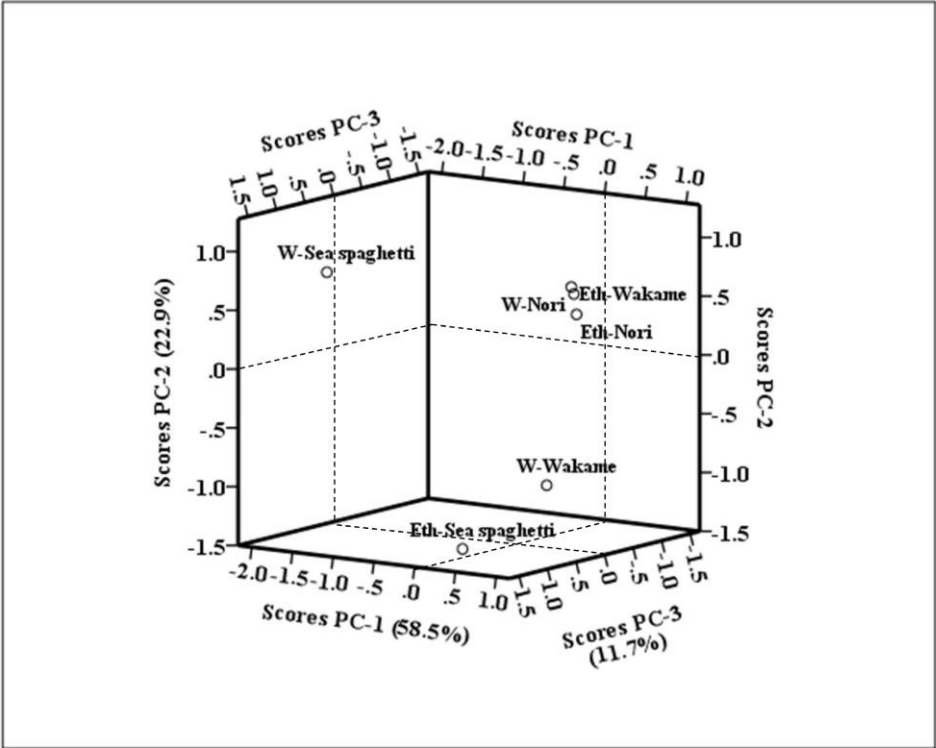


Figure 3

Figure 4

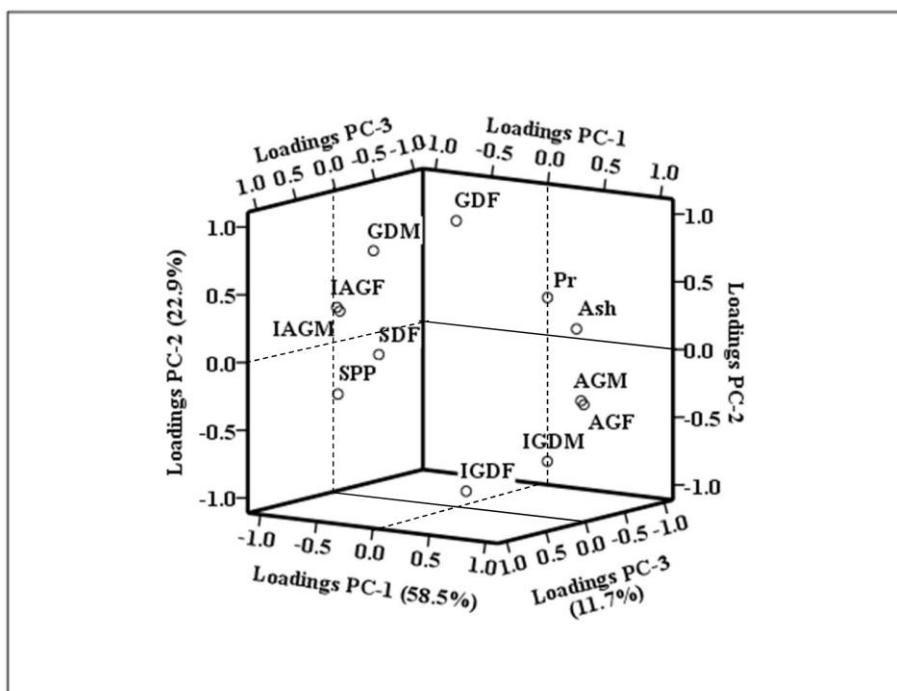


Figure 4

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: TextBMCComplAlternMedhighlighted.doc, 324K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1267674422108034/supp1.doc>

Additional file 2: figuresBMCCompAltrnMed2D.ppt, 168K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/6106149551080350/supp2.ppt>

## 6. DISCUSIÓN

Las algas son ricas en proteínas, vitaminas y minerales, y aunque su contenido en grasas es reducido, un elevado porcentaje de sus ácidos grasos corresponde a AGP (Bocanegra y cols., 2009; Sánchez-Muniz y cols., 2013). En trabajos anteriores de nuestro grupo se revisaron las propiedades nutricionales de las algas, así como su papel en la salud cardiovascular (Bocanegra y cols., 2009; Sánchez-Muniz y cols., 2013). Se evidenció que las propiedades de estos vegetales son muy dependientes de la especie considerada, de su composición individual, de la zona donde crecen o se cultivan, por lo que cualquier generalización al respecto puede resultar engañosa e inadecuada desde el punto de vista científico. La incorporación de algas en productos cárnicos hace que por un lado, el sistema alga-carne posea proteínas de calidad, y por otro que las algas aporten a estos derivados cárnicos compuestos con efectos antioxidantes y beneficiosos a nivel cardiovascular y hepático.

Para una mejor comprensión de la investigación realizada, la discusión se ha dispuesto siguiendo, dentro de lo posible, el planteamiento establecido a nivel de objetivos y diseño experimental. En tal sentido, esta sección se ha configurado en grandes apartados para terminar en una sección de integración. En ellas se recogen los aspectos relativos a cada uno de los objetivos específicos y del objetivo principal del mismo: estudiar el efecto del consumo sistemas cárnicos conteniendo algas, fundamentalmente a nivel cardiovascular.

### 6.1. Estudio de la aceptabilidad de los cárnicos reestructurados con algas. Efectos sobre ingesta dietética, índice de eficacia alimentaria y crecimiento

Si se comparan los datos de ingesta de los diferentes lotes con los de Bocanegra y cols. (2006); Viejo y cols. (2003); Sánchez-Muniz y cols. (2002) puede afirmarse que la aceptación de las dietas experimentales fue adecuada. La inclusión de colesterol en las dietas con RC control y RC con algas no modificó sensiblemente la ingesta. En un estudio anterior (Bocanegra y cols., 2003), la introducción de algas desecadas en la dieta a un nivel bastante elevado (7%) no afectó a la aceptabilidad de la misma. El crecimiento de las ratas (expresado como ganancia de peso) fue bueno en términos generales, aunque, el consumo de RC con algas Nori y Espagueti de Mar tendió ligeramente a reducirlo, lo que condicionó un índice de conversión (ganancia de peso/ingesta) también ligeramente menor (**Figura 18**). Esto quizás se debe al alto contenido de fibra soluble (Bocanegra y cols., 2003; Cofrades y cols., 2008), a la baja



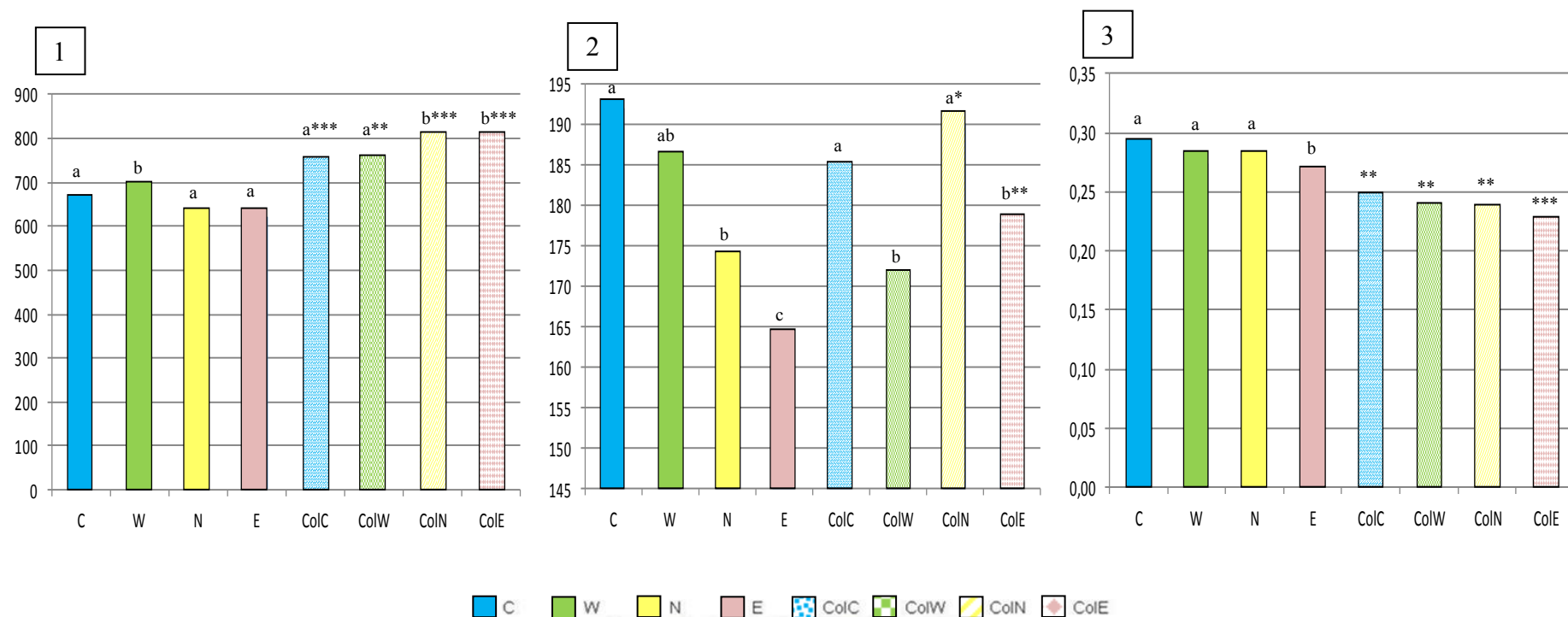
biodisponibilidad energética de las algas (Bocanegra y cols., 2009), o a su alto contenido en polifenoles, especialmente en Espagueti de Mar (Cofrades y cols., 2010). La ganancia de peso fue más elevada que en otros trabajos (Bocanegra y cols., 2006), aunque la media de ingesta fue un 10% menor. Estas diferencias podrían deberse, entre otros factores, a la incorporación en la dieta de mayor cantidad de grasa y de cárnicos con algas en vez de algas.

Terpend y cols. (2012) demostraron que respecto al grupo control, el consumo de 40 y 400 mg/kg/día de un alga marrón el *Ascophyllum Nodosum*, como parte de una dieta enriquecida en grasa, redujo la ganancia de peso en un 22% y 31,8%, respectivamente. Resultados similares han sido publicados por Park y cols. (2012) en un estudio con algas marrones en el marco de una dieta enriquecida en grasa. Oben y cols., (2007) indican que la introducción en dietas hipocalóricas de algunas algas podría ser de utilidad, ya que una infusión al día de ProAlgaZyme, durante 10 semanas, redujo el peso y la grasa corporal.

De acuerdo con Bocanegra y cols., (2006) y Murata y cols., (2002), el peso corporal se afectó negativamente con la suplementación de colesterol. Sin embargo, los grupos de experimentación que recibieron dietas hipercolesterolemiantes (ColC, ColW, ColN y ColE) consumieron más dieta que sus correspondientes basales (C, W, N y E), lo que explica el menor índice de conversión.

## **6.2. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos con algas sobre el sistema antioxidante y la expresión génica.**

A nuestro entender, esta Tesis Doctoral es el primer estudio donde se investigan los efectos sobre la actividad y expresión génica de las enzimas antioxidantes y del consumo de dietas conteniendo reestructurados cárnicos con algas, y suplementadas o no con colesterol. Los resultados comentados en esta subsección se han publicado en las revistas indexadas *Plant Foods for Human Nutrition* (2010) y en *Food Chemistry* (2011), tal como se ha señalado previamente en la sección de Resultados-Publicaciones.

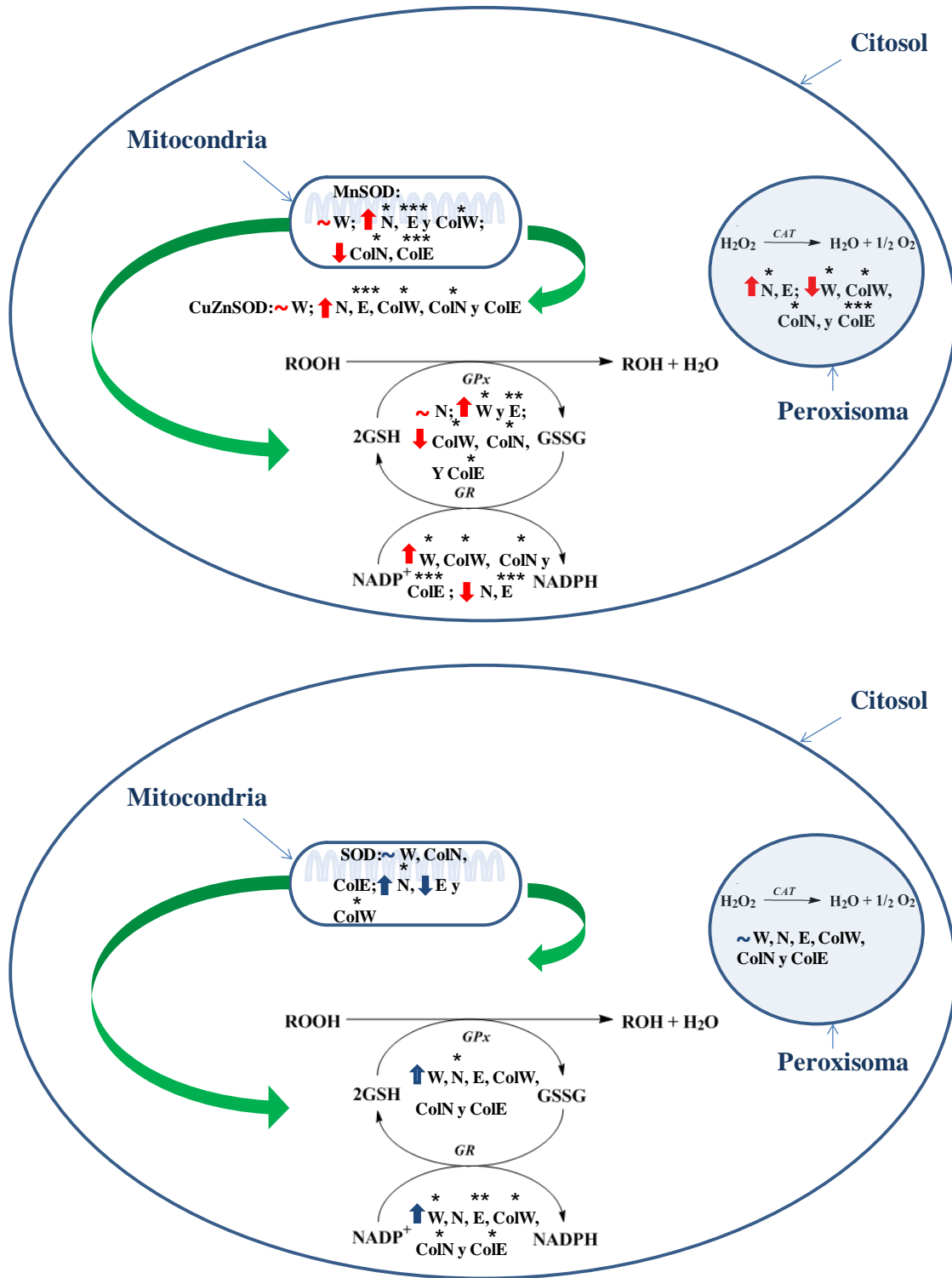


**Figura 18. 1.- Ingesta (g); 2.- Ganancia de peso (g); 3.- Índice de conversión (incremento de peso/ganancia de peso)** en ratas Wistar alimentadas con dietas conteniendo cárnicos reestructurados (RC), adicionadas o no con agentes hipercolesterolemiantes. C, RC-Control; W, RC con Wakame; N, RC con Nori; E, RC con Espagueti de Mar; Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. Se encontró interacción significativa del tipo de RC con la adición de colesterol dietético sobre la ingesta ( $p<0,001$ ) y ganancia de peso ( $p<0,05$ ). Las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ).

La carne de cerdo posee alto contenido en hierro y cobre (Jiménez-Colmenero, 2007; Moreira y cols., 2011), siendo conocido que una carga de hierro produce peroxidación lipídica y daño oxidativo (Toxqui y cols., 2010). No obstante, la inclusión de algas, con un contenido potencialmente elevado de antioxidantes, equilibraría el efecto pro-oxidante del hierro y/o del cobre (Bocanegra y cols., 2009). Los datos de esta Tesis Doctoral sugieren que la dieta conteniendo reestructurados cárnicos con Nori afecta el mecanismo antioxidante a través del sistema que involucra las enzimas GPx total, GR y actividad de la SOD.

Sin embargo, en las ratas que consumen dieta con RC-Wakame se incrementaron solamente los valores de GR, sugiriendo que la disminución del índice redox se produce<sup>a</sup> por el aumento del reciclado del glutathion (**Figura 19**). Solamente en el grupo cárnico con Wakame sin colesterol añadido los niveles de ARNm de la CAT disminuyeron significativamente. La actividad de la CAT no se afectó por el consumo del cárnico con algas. Estos resultados, y en particular los del grupo que consume cárnico con Wakame, se asemejan a los de Murata y cols. (2002) que observaron que dietas conteniendo Wakame no tuvieron efectos significativos en la actividad de la CAT en ratas. Por otra parte, los datos señalan que la dieta conteniendo cárnico con Espagueti de Mar afectó el estatus antioxidante a través de incrementar la expresión génica de casi todas las enzimas antioxidantes estudiadas. Entretanto, las actividades enzimáticas y las concentraciones de sustrato, con excepción de la GR, GSSG y el índice redox, no se afectaron significativamente.

El incremento de GR y la reducción de GSSG apuntan a un reciclado del glutathion que se explica por la bajada del índice redox. Los resultados del cárnico con Espagueti de Mar señalan que la presencia de alga y colesterol, comparado con sólo colesterol en la dieta, modifica y revierte la expresión génica de la GR. Estos resultados son difíciles de explicar, sin embargo parecen estar relacionados con los efectos hipocolesterolemiantes del alga Espagueti de Mar. A su vez, la comparación de los resultados de las actividades y expresión génica de las enzimas antioxidantes (Figura 19) parecen no concordar; sin embargo, algunos estudios sugieren que estos dos parámetros no siempre siguen un curso paralelo (Sadi y Guray, 2009) y pueden ser debidos a los eventos post-transcripcionales que podrían resultar en la pérdida de moléculas funcionales, menos cambios post-transcripcionales, y finalmente, ausencia de cambios en las actividades de GPx y GR.



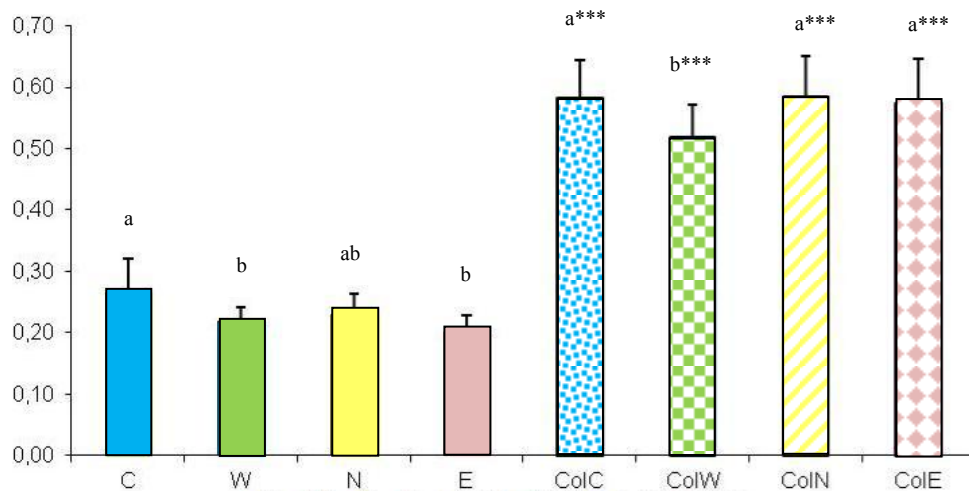
**Figura 19.** Resumen de los cambios en el sistema antioxidante, señalando modificaciones en las expresiones génicas y actividades de las enzimas antioxidantes CAT, MnSOD, CuZnSOD, GPx y GR por el consumo de dietas conteniendo reestructurados cárnicos (RC), adicionadas o no con agente hipercolesterolemizante. C, RC Control; W, RC con Wakame; N, RC con Nori; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, RC con Wakame y colesterol más ácido cólico; ColN, RC con Nori y colesterol más ácido cólico; ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. **Flechas en rojo ( $\Rightarrow$ )** representan expresión génica. **Flechas en azul ( $\Rightarrow$ )** cambios en la actividad enzimática. La orientación de las flechas indica incremento o reducción de la actividad frente a sus respectivos controles. Los asteriscos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) el cambio significativo vs. sus controles (N, W, E vs. C o ColN, ColW, ColE, vs. ColC). Las flechas grandes indican que la actividad existe en la mitocondria y dentro de la célula.

Los mecanismos por los cuales las dietas RC con las algas Wakame, Nori y Espagueti de Mar influyen de forma distinta las actividades y los niveles de expresión génica de la CAT, Mn-SOD y actividad de GSH (Figura 19) no ha sido identificados; sin embargo deben relacionarse con sus contenidos en polifenoles, fibra, minerales, y ácidos grasos (Bocanegra *y cols.*, 2009; Sánchez-Muniz *y cols.*, 2013). Las algas marrones presentan altas concentraciones de florotaninos (Glombitza y Keusgen, 1995), y se ha definido que los polímeros de florotaninos inhiben las enzimas implicadas en la producción/eliminación de radicales libres (Shibata *y cols.*, 2003; Kang *y cols.*, 2004), la producción de GSH y glutatión total (Nikaido *y cols.*, 2003). También la presencia de metales pesados podría estar implicada en las modificaciones observadas en el estatus antioxidante. Así, Bocanegra *y cols.* (2006) propusieron los efectos negativos sobre el estatus del glutatión del Arsénico contenido en Konbu y en menor cuantía en Nori. El contenido de Arsénico en las dietas experimentales de esta Tesis Doctoral es más bajo que el observado en las dietas del estudio de Bocanegra *y cols.* (2006), por lo que pensamos que el incremento observado en los valores de GR podría equilibrar el efecto negativo del Arsénico sobre los niveles de GSH.

Por otro lado, el estatus redox celular y la razón GSSG/total glutatión están involucrados en la activación de factores transcripcionales como API o NF- $\kappa$ B que participan en la expresión génica de enzimas antioxidantes. Las dietas enriquecidas en colesterol inducen estrés oxidativo, medido como TBARS, resultados que coinciden con los de Lin *y cols.* (2004). El consumo del colesterol redujo la mayor parte de las actividades enzimáticas en los grupos ColC, ColW, ColN y ColE respecto a sus respectivos controles sin colesterol.

Estos resultados contrastan con los de Bocanegra *y cols.* (2006) que encontraron que el consumo del colesterol incrementó significativamente (alrededor de 1,5 veces) las actividades enzimáticas de GPx-Se, GPx-total y GR. Como se ha comentado anteriormente, la carne posee alta cantidad de hierro, aspecto que puede incrementar la producción de radicales libres (Wright *y cols.*, 1999). De hecho, los niveles de GSSG en los animales del grupo C son más elevados que en el estudio de Bocanegra *y cols.* (2006). Aunque los RC con Wakame no bloquearon de forma efectiva la disminución de GSH inducida por el colesterol dietético, los animales ColW comparado con los ColC, mostraron altos niveles de expresión génica de GR, Cu,Zn-SOD, y Mn-SOD, y bajos niveles de expresión génica de GPx, sugiriendo que la dieta ColW afecta positivamente al estatus antioxidante al mantener niveles elevados de GSH. Los valores

de GSH y del índice redox de los grupos ColN y ColE, y en menor cuantía del ColW (Figura 20) indican que su dieta no mejoró el estatus antioxidante, aunque incrementó los niveles de la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes (Figura 19). Ringseis y Eder. (2004) concluyeron que el colesterol dietético oxidado da lugar a incrementos de los niveles de expresión génica de GPx, SOD y actividad de GPx; sin embargo, se encontraron bajas concentraciones de glutathion total y GSH en el hígado de ratas que habían consumido dietas conteniendo colesterol no oxidado (Ringseis y Eder. (2004).

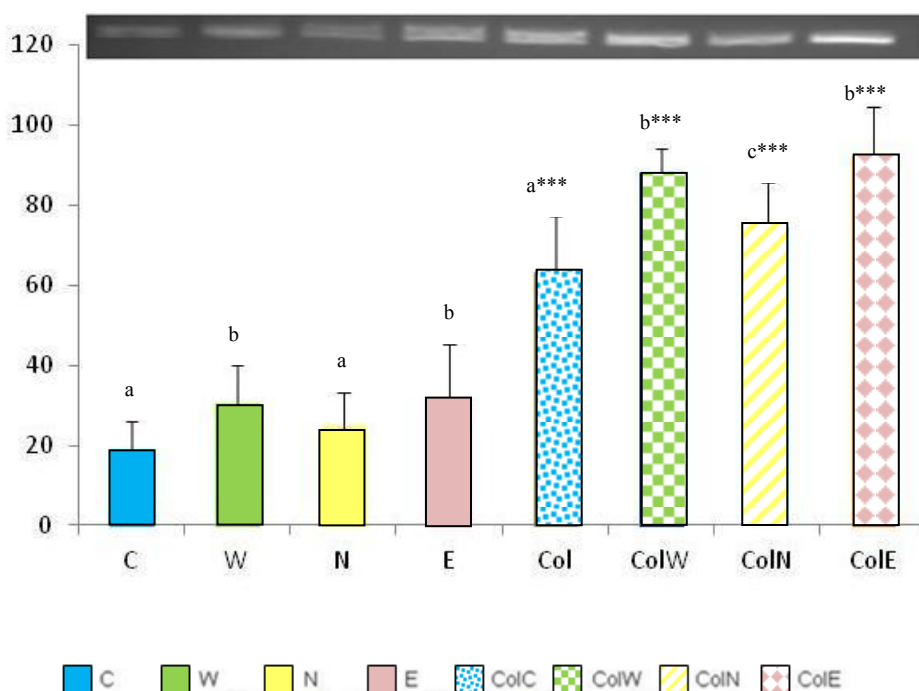


**Figura 20. Efectos del consumo de dietas, conteniendo reestructurados cárnicos (RC) con algas, añadidas o no con agente hipercolesterolemizante sobre el índice redox (GSSG/Glutathion total).** C, RC Control; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. Se encontró interacción significativa ( $p<0,001$ ) del tipo de RC con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p<0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\*\*\*) ( $p<0,001$ ).

El colesterol es eliminado del cuerpo principalmente vía producción de ácidos biliares. La enzima Colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) es limitante en la síntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol, catalizando la formación del 7 $\alpha$ -hidroxi-colesterol. La CYP7A1 es una hemo-enzima, isoforma del citocromo P450, que oxida el colesterol utilizando oxígeno molecular (Cadenas y Davies, 2000). Los resultados obtenidos en la expresión génica de la CYP7A1 sugieren que la eliminación del colesterol en el grupo ColC se incrementó, aunque este efecto podría inducir estrés oxidativo con la producción del anión superóxido (Cadenas y Davies, 2000). Los niveles más elevados de expresión génica de la CYP7A1 de los grupos ColW y ColE sugieren que en estos grupos debe incrementarse la vía del colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa para promover la eliminación del colesterol; no obstante, como se ha indicado, incrementaría la oxidación hepática a través de aumentar la producción de especies reactivas del oxígeno y, lo que es más paradójico, la reducción de colesterol en el lote ColW no llega a ser significativa. La expresión génica de la CYP7A1 se incrementó en todos los grupos con colesterol sugiriendo la mejora en la eliminación del colesterol en estos grupos (Figura 21).

De acuerdo con los datos de esta Tesis Doctoral, se puede decir que el incremento de radicales libres inducidos por el consumo del colesterol y la conversión del colesterol a ácido cólico son parcialmente bloqueados por las propiedades antioxidantes de las algas. El mecanismo por el cual las dietas enriquecidas con el colesterol y el alga influyen los niveles de colesterol y las expresiones génicas y actividades de las enzimas antioxidantes deben ser relacionadas con su contenido en polifenoles, fibra, minerales y contenido de ácidos grasos (Bocanegra y cols., 2009), así como por la presencia en la carne de sustancias pro y antioxidantes.





**Figura 21. Efectos del consumo de dietas, conteniendo reestructurados cárnicos (RC) con algas, añadidas o no con agente hipercolesterolemizante sobre la expresión génica de la CYP7A1 (colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa).** C, RC Control; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. Las bandas son un ejemplo representativo de la densitometría en el gel de agarosa 1,8%. Se encontró interacción significativa ( $p < 0,001$ ) del tipo de RC con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos ( $p < 0,001$ ).

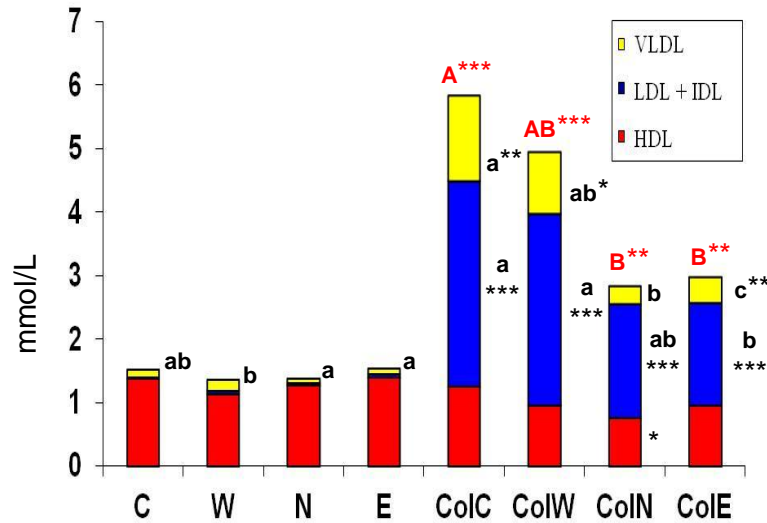
### 6.3. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos sobre el perfil lipoproteico

Esta Tesis Doctoral demuestra por primera vez los efectos de la incorporación de cárnicos reestructurados conteniendo algas a dietas enriquecidas o no en colesterol sobre la actividad de la AE y el perfil lipoproteico. Los datos referentes a la acción de estos cárnicos modificados sobre el perfil lipoproteico han sido publicados en *British Journal of Nutrition* y otros están pendientes de aceptación por *Journal of Medicinal Foods*.

Varios modelos animales han sido utilizados en el estudio del colesterol y de la aterogénesis; sin embargo, ninguno puede considerarse perfecto en cuanto a la extrapolación de los resultados a los humanos (Jacques, 1990). Las ratas son los animales más utilizados en el estudio del metabolismo del colesterol y frecuentemente empleados para conocer los efectos sobre el colesterol plasmáticos de las proteínas de la dieta (Jacques; 1990; Chiang y cols., 1998; Sánchez-Muniz y cols., 1992a; Sánchez-Muniz y cols., 1992b). La caseína dietética no induce hipercolesterolemia cuando la

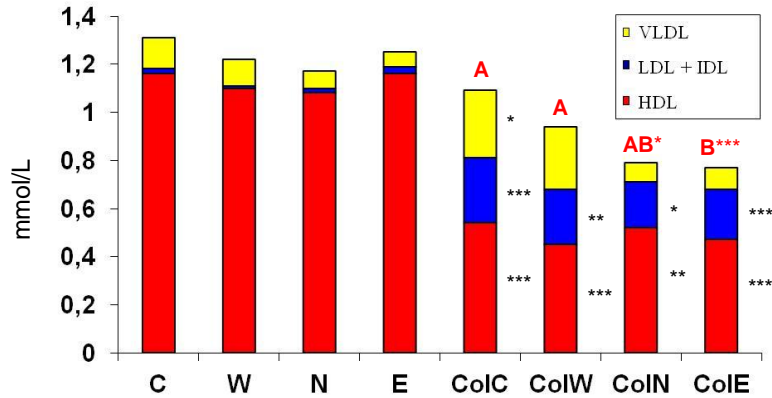
dieta no contiene colesterol añadido (Viejo y cols., 2003), por lo que se han empleado bilis bovina o la sal sódica del ácido cólico para incrementar la absorción del colesterol dietético y por tanto el efecto hipercolesterolemizante de dicho esteroide (Jacques; 1990; Chiang y cols., 1998; Sánchez-Muniz y cols., 1992a; Sánchez-Muniz y cols., 1992b; Terpstra y cols., 2000). En esta Tesis Doctoral, hemos observado, de acuerdo con otros estudios (Bocanegra y cols., 2009; Sanchez-Muniz & Bastida, 2008; Vázquez & Sánchez-Muniz, 1994) que cuando no se añadió colesterol a la dieta, los niveles plasmáticos en las ratas de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos se mantienen normales (**Figuras 22-24**).

Además, el cociente colesterol/fosfolípidos, utilizado como marcador de hipercolesterolemia (Sánchez-Muniz y Bastida, 2008), permaneció bajo en los lotes Control, Wakame, Nori y Espagueti de Mar, sugiriendo normocolesterolemia en todos ellos (Sanchez-Muniz y Bastida, 2008). La actividad de la AE fue más elevada en los lotes que consumieron cárnicos con algas, sugiriendo elevación del estatus antioxidante. La AE está asociada a las HDL y a otras lipoproteínas (Fuhrman y cols., 2005) y está involucrada en el metabolismo de las lipoproteínas e inhibe la lipoperoxidación de las LDL y HDL (Aviram, 2004; Canales & Sanchez-Muniz, 2003; Nus y cols, 2007a). La actividad de la AE se incrementa en voluntarios que consumen polifenoles de la granada (Rock y cols., 2008) o algas (Bocanegra y cols., 2009). La presencia de antioxidantes y otros fitoquímicos en las algas (Bocanegra y cols., 2009) podría, pues, explicar parcialmente los valores óptimos de la actividad de la AE en los lotes con Wakame, Nori y Espagueti de Mar comparados con los del grupo Control. El mismo efecto o tendencia se observó después de ajustar los datos de AE para los niveles de colesterol y HDL-colesterol.

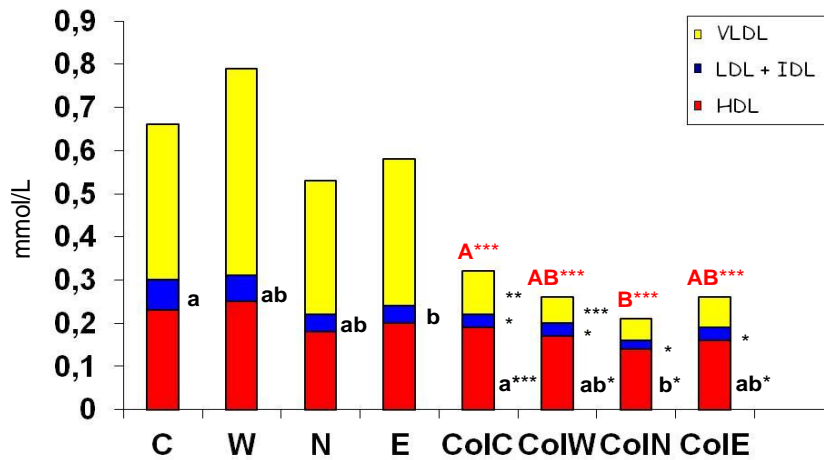


**Figura 22.** Efectos del consumo de dietas, conteniendo reestructurados cárnicos (RC) con algas, añadidas o no con agente hipercolesterolemizante sobre los niveles de colesterol en plasma y en las fracciones VLDL, LDL + IDL, y HDL. C, RC Control; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. Se encontró interacción significativa (al menos  $p < 0,05$ ) del tipo de RC con la adición de colesterol dietético para el colesterol total; VLDL y IDL+LDL. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Letras y asteriscos en rojo se refieren a los datos de colesterol total en plasma. Para transformar mmol/L a mg/dL, multiplicar por 38,68.

Los niveles de los triglicéridos en los grupos Nori y Espagueti de Mar tienden a ser más bajos que en el grupo control, sin embargo, en el grupo Wakame tienden a ser más elevados (**Figura 24**). Bocanegra y cols (2009), después de 3 semanas de estudio, observaron que los niveles postprandiales de los triglicéridos en el grupo control eran similares a los del grupo que recibió dieta Nori, mientras que Murata y cols. (2001) encontraron que las concentraciones de triglicéridos y colesterol en plasma e hígado disminuyeron en ratas alimentadas durante 4 semanas con una mezcla de pescado y Wakame.



**Figura 23.** Efectos del consumo de dietas, conteniendo reestructurados cárnicos (RC) con algas, añadidas o no con agente hipercolesterolemizante sobre los niveles de fosfolípidos en plasma y en las fracciones VLDL, LDL + IDL, y HDL. C, RC Control; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. No se encontró interacción significativa del tipo de reestructurado cárnico con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Letras y asteriscos en rojo se refieren a los datos de colesterol total en plasma. Para transformar mmol/L a mg/dL, multiplicar por 75.



**Figura 24.** Efectos del consumo de dietas, conteniendo reestructurados cárnicos (RC) con algas, añadidas o no con agente hipercolesterolemizante sobre los niveles de triglicéridos en plasma y en las fracciones VLDL, LDL + IDL, y HDL. C, RC Control; E, RC con Espagueti de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espagueti de Mar y colesterol más ácido cólico. No se encontró interacción significativa del tipo de RC con la adición de colesterol dietético ni para enl plasma ni para las diferentes lipoproteínas. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (C, W, N y E ó ColC, ColW, ColN y ColE) se señalan mediante letras distintas. El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColW vs. W; ColN vs. N; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Letras y asteriscos en rojo se refieren a los datos de triglicéridos en plasma. Para transformar mmol/L a mg/dL, multiplicar por 89.

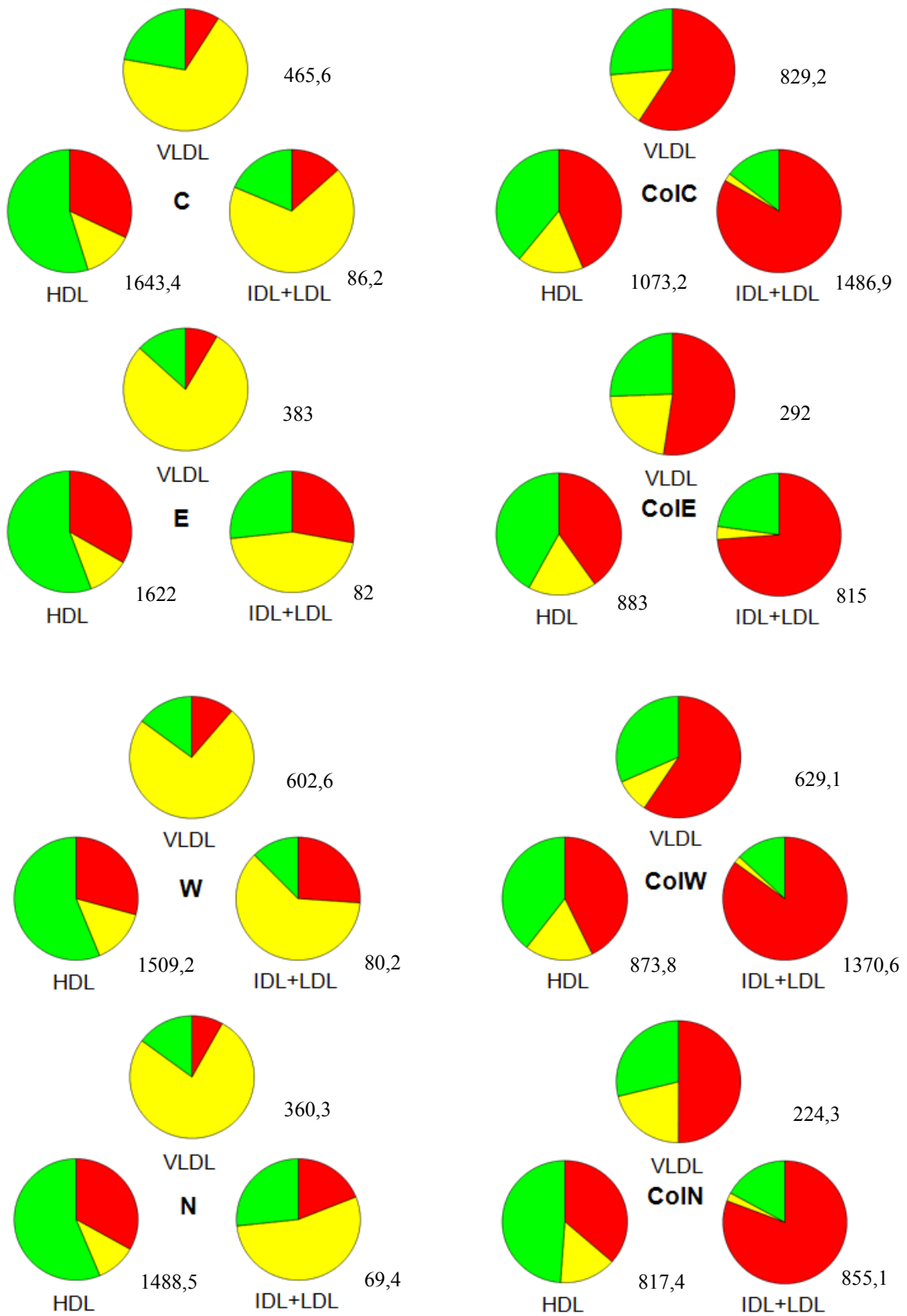
El contenido absoluto de lípidos y la composición del IDL+LDL y HDL en el grupo control son comparables a los de otros estudios (Wong y cols., 1999; Garrido-

Polonio y cols., 2004). Los niveles de HDL-colesterol y HDL-fosfolípidos suponen 80-85% de la colesterolemia (Figura 22) o de la fosfolipemia (figura 23). Además, las ratas poseen una captación efectiva de las VLDL y baja transferencia de ApoB desde las VLDL a las LDL (Sigurdsson y cols., 1975), lo cual explica los niveles reducidos de LDL encontrados en la presente Tesis Doctoral y en estudios previos (Wong y cols., 1999; Sánchez-Muniz y Bastida, 2008; Garrido-Polonio y cols., 2004; Sánchez-Muniz y cols., 2003).

Las diferencias en los niveles de lípidos y lipoproteínas entre los grupos sin colesterol añadido deben ser atribuidas a diferencias en el contenido de fibra total y soluble de las dietas, y a otros componentes, como los minerales, que podrían afectar la lipemia (Bocanegra y cols., 2009a; Bocanegra y cols., 2009b; Gueux y cols., 1996; Sánchez-Muniz, 2012). Estudios previos de nuestro grupo (Bocanegra y cols., 2003) demostraron la presencia de restos de algas en el ciego de ratas alimentadas con alga Konbu, pero no en las que ingirieron dietas conteniendo Nori, sugiriendo claras diferencias en el tiempo de vaciamiento gástrico y en la velocidad de digestión de las dos dietas con algas.

En términos generales la composición de las fracciones de las lipoproteínas en los grupos Control, Wakame, Nori y Espagueti de Mar fueron bastante similares con ligeras diferencias en la contribución de colesterol y triglicéridos a la masa lipídica de las HDL en grupo Wakame respecto al de Nori y Espagueti de Mar (**Figura 25**).

De acuerdo con otros estudios (Chiang y cols., 1998; Sánchez-Muniz y cols., 1992; Krauss y cols., 2000; Fukushima y cols., 2001; Bocanegra y cols., 2009; Viejo y cols., 2003; Sánchez-Muniz y cols., 2003) la dieta ColC indujo hipercolesterolemia y disminuyó la trigliceridemia (**Figuras 22 y 24**). Esto se traduce en la producción de gran cantidad de  $\beta$ -VLDL e IDL+LDL, y en la reducción de la cantidad de lípidos totales transportados por las HDL (Figuras 22-25) como discutiremos a continuación.



**Figura 25. Contribución (%) de los diferentes lípidos a la masa lipídica total de VLDL, IDL+LDL y HDL en ratas alimentadas con las dietas C, W, N, E, ColC, ColW, ColN y ColE.** ■ colesterol; ■ triglicéridos; y ■ fosfolípidos. Contenido total de lípidos (mg/L) transportado por las lipoproteínas a la derecha.

Las dietas ColN y ColE bloquearon parcialmente la hipercolesterolemia observada en las dietas ColC y ColW. El mayor contenido de fibra soluble (Cofrades y cols., 2008) y polifenoles de las algas Nori y Espagueti de Mar que de Wakame podría estar involucrado en el efecto menos hipercolesterolemiantes de las dietas ColNori y ColEspagueti de Mar. Los resultados observados para el grupo ColNori son similares a los del estudio de Bocanegra y cols. (2009) después de añadir un 7% de alga Nori a la dieta conteniendo la misma proporción de agente hipercolesterolemiantes que en este estudio. También el cociente colesterol/fosfolípidos se reduce marcadamente en los grupos ColNori (1,77) y ColEspagueti de Mar (2,0) respecto a ColControl (2,75) y ColWakame (2,76), aspecto que señala el efecto hipocolesterolemiantes de las mismas de acuerdo con Sanchez-Muniz y Bastida (2008).

El consumo de dietas hipercolesterolemiantes incrementó la actividad de la AE en los grupos ColC y ColW; sin embargo, esto no se observó en los grupos ColN y ColE, por lo que puede especularse que algunos componentes de las algas estarían involucrados en estos resultados. El RC con Nori contiene más hierro que el RC con Wakame, el RC control o el RC con Espagueti de Mar, por lo que podría esperarse un mayor efecto pro-oxidante en el grupo ColN que en los otros grupos que recibieron dietas enriquecidas con el colesterol.

Como hemos comentado, el colesterol es principalmente eliminado del cuerpo vía producción de ácidos biliares y la biosíntesis de ácido cólico a través de la acción de la isoenzima CYP7A1 del citocromo P450 incrementa la producción de radicales libres (Cadenas y Davies, 2000). Además, la actividad de la AE podría “gastarse” para reducir el daño peroxidativo en las lipoproteínas del plasma y de las membranas celulares (Reilly y cols., 1998; Aviram y cols., 1998; Canales y Sanchez-Muniz, 2003), actuando como una enzima “suicida” (Aviram y cols., 1998), lo que explicaría los niveles de AE observados en los grupos ColNori y ColEspagueti de Mar. Estos resultados son diferentes de los encontrados por Bocanegra y cols (2009), donde la AE disminuyó en ratas controles no ayunadas alimentadas con dietas AIM-93 adicionadas con agente hipercolesterolemiantes, pero no en el caso de recibir dietas AIM-93 adicionadas de colesterol y 7% de alga Nori. El ayuno nocturno, la duración de la intervención nutricional, y/o la presencia de ciertos componentes de la carne, como el hierro, podrían explicar las diferencias entre estos dos estudios.



Los niveles de colesterol se incrementaron en todos los grupos que consumieron dietas a las que se añadió colesterol, especialmente en los grupos ColControl y ColWakame debido a un incremento de VLDL-colesterol (Bocanegra y cols., 2009; Beynen y cols., 1984; Chiang y cols., 1998; Sánchez-Muniz y cols., 2003). Las VLDL enriquecidas en colesterol se conocen con el nombre de  $\beta$ -VLDL y han sido reconocidas como aterogénicas en modelos experimentales como consecuencia del consumo de colesterol (Viejo et al., 2003). Respecto al grupo ColControl, las concentraciones de VLDL-colesterol disminuyeron significativamente sólo en los grupos que habían recibido las dietas ColNori ó ColEspagueti (Figura 22). Estos datos indican que estas dos últimas dietas disminuyen los niveles de  $\beta$ -VLDL, parcialmente a través de normalizar la composición de la fracción VLDL (Figura 25). Ciertas investigaciones sugieren que algunas fracciones solubles de las algas o polisacáridos aislados de las mismas tienen actividades hipocolesterolemiantes y anti-hipertensivas en animales, descubrimiento que podría explicar el efecto reductor de la colesterolemia de las dietas ColN y ColE observado en esta Tesis Doctoral (Wong y cols., 1999; Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000; Sánchez-Muniz, 2012).

La distribución de los fosfolípidos en las fracciones VLDL, IDL+LDL y HDL también se modificó de forma neta reduciéndose en las HDL e incrementándose de manera marcada en las VLDL y en las IDL+LDL (Fig 23). También el transporte de fosfolípidos por las VLDL respecto al total plasmático fue menor en los lotes ColNori y ColEspagueti respecto al grupo ColControl.

El contenido de lípidos de la fracción (IDL + LDL) se incrementó en los animales que consumieron las dietas enriquecidas en colesterol (Figuras 22-24). No obstante, este aumento fue de menor magnitud en los grupos que recibieron las dietas ColNori y ColEspagueti de Mar que en aquellos que ingirieron las dietas ColControl o ColWakame. Además, las ratas poseen una captación efectiva de VLDL y baja transferencia de Apo B de VLDL a LDL (Sigurdsson y Lewis, 1975). De acuerdo con Havel (1984), las partículas VLDL de mayor tamaño en ratas y otros animales contribuyen menos a la formación de las LDL que las VLDL más pequeñas.

Los niveles de HDL-colesterol y HDL-fosfolípidos fueron menores en los grupos que recibieron las dietas ColControl, ColWakame, ColNori y ColEspagueti de Mar que en sus controles respectivos C, W, N y E (Figuras 22 y 23). Para la excreción del colesterol por la bilis, el receptor hepático *scavenger* B-I posee una función esencial en la captación hepática del HDL-colesterol y de los ésteres de colesterol (Acton y cols.,

1996; Mardones *y cols.*, 2001; Zhou *y cols.*, 2006). La deficiencia del receptor scavenger B-I resulta en un incremento significativo en los niveles de HDL-colesterol y de las lesiones ateroscleróticas en ratones (Braun *y cols.*, 2000). Deficiencias del receptor *scavenger* B-I y en Apo E alteran el metabolismo de las lipoproteínas, el tamaño de VLDL y de HDL (Braun *y cols.*, 2000). Esto podría explicar los valores reducidos de HDL-colesterol en los grupos que han consumido dietas con colesterol añadido respecto a aquellos a las que no se incorporó.

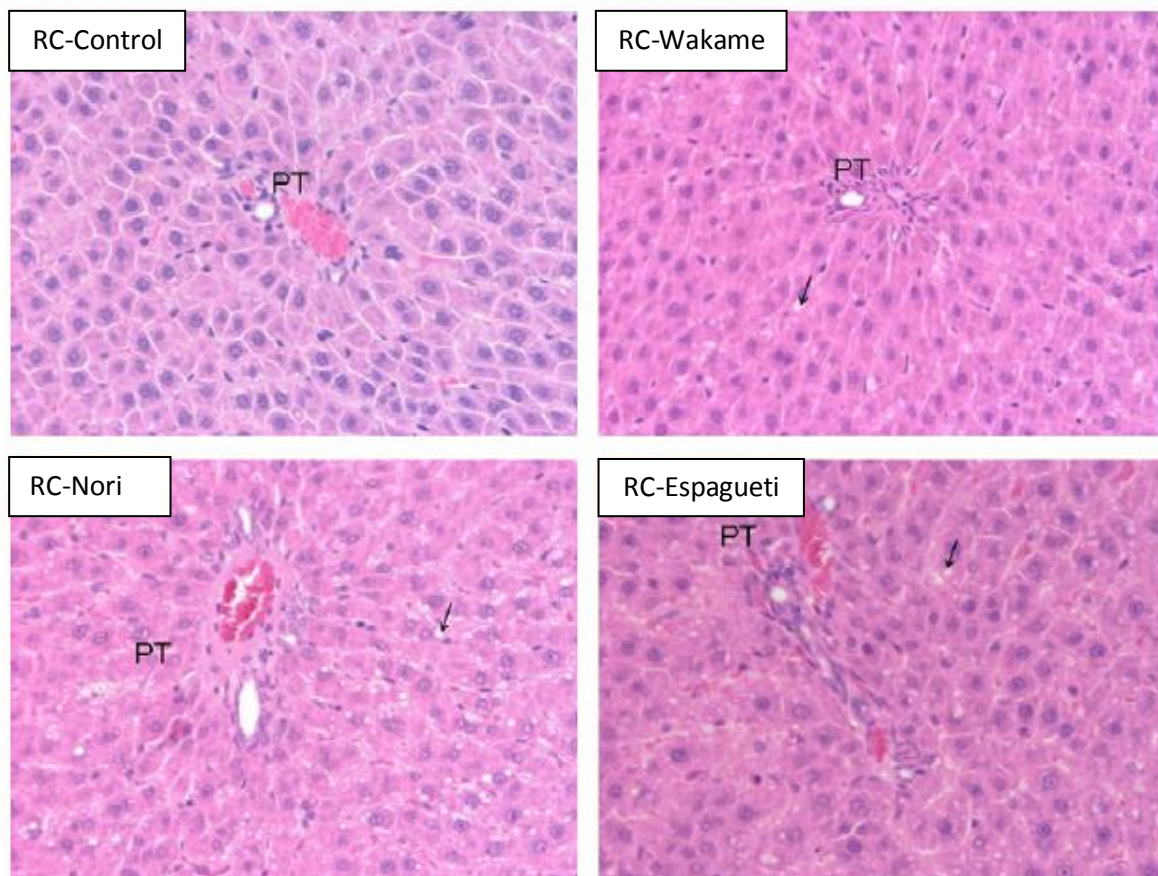
Los efectos del consumo de colesterol sobre la composición de las IDL+LDL y HDL pueden contemplarse en la Figura 25. Así, las partículas HDL se enriquecen en colesterol y empobrecen en fosfolípidos respecto a sus controles sin colesterol. Este cambio fue menos marcado en el grupo ColNori como consecuencia del mayor potencial reductor de colesterol del alga Nori. También fue neto el enriquecimiento en colesterol y el empobrecimiento en triglicéridos de la fracción IDL+LDL en los lotes que ingieren colesterol y la tendencia a elevar el contenido de fosfolípidos del grupo ColEspaguetti de Mar (Figura 25).

Considerando todas los aspectos discutidos en esta sección 6.3 puede resumirse que el consumo de RC con Nori o Espaguetti de Mar en el marco de dietas enriquecidas en colesterol induce una reducción en el número de partículas lipoproteicas (preferentemente VLDL y LDL +IDL) dadas las reducciones lipídicas y de la masa total de lípidos que tienen lugar en todas las lipoproteínas (Figuras 22-24), pero sin que cambie la composición lipídica media de estas partículas.

#### **6.4. Efectos del consumo de cárnicos reestructurados sobre la estructura y morfología del hígado**

Los datos del estudio histológico y estructural del hígado han sido publicados en la revista Food and Chemical Toxicology 56 (2013) 223–230. En la **figura 26** vemos que los hígados del grupo C presentaron características histológicas normales de acuerdo con la estructura de los lóbulos y de los espacios porta. A mayor ampliación (200 x), todos los elementos celulares del hígado están en correcta proporción y demuestran características típicas. Los hepatocitos aparecen poligonales, presentan un núcleo eucromático, localizado en el ecuador de la célula, con su nucleolo. La proporción de los hepatocitos binucleados fue normal. El citoplasma, vacuolado, demostró un grado diferente de eosinofilia dependiendo de su actividad funcional. Las células de Kupffer

localizadas a nivel sinusoidal no sugieren movilización macrofágica. El sistema canicular tuvo la apariencia de epitelio cúbico normal. Las características histológicas demostraron que los grados de degeneración hidrópica, vacuolar y de necrosis de células individuales, eran pequeñas y propias de ratas Wistar normales en crecimiento.

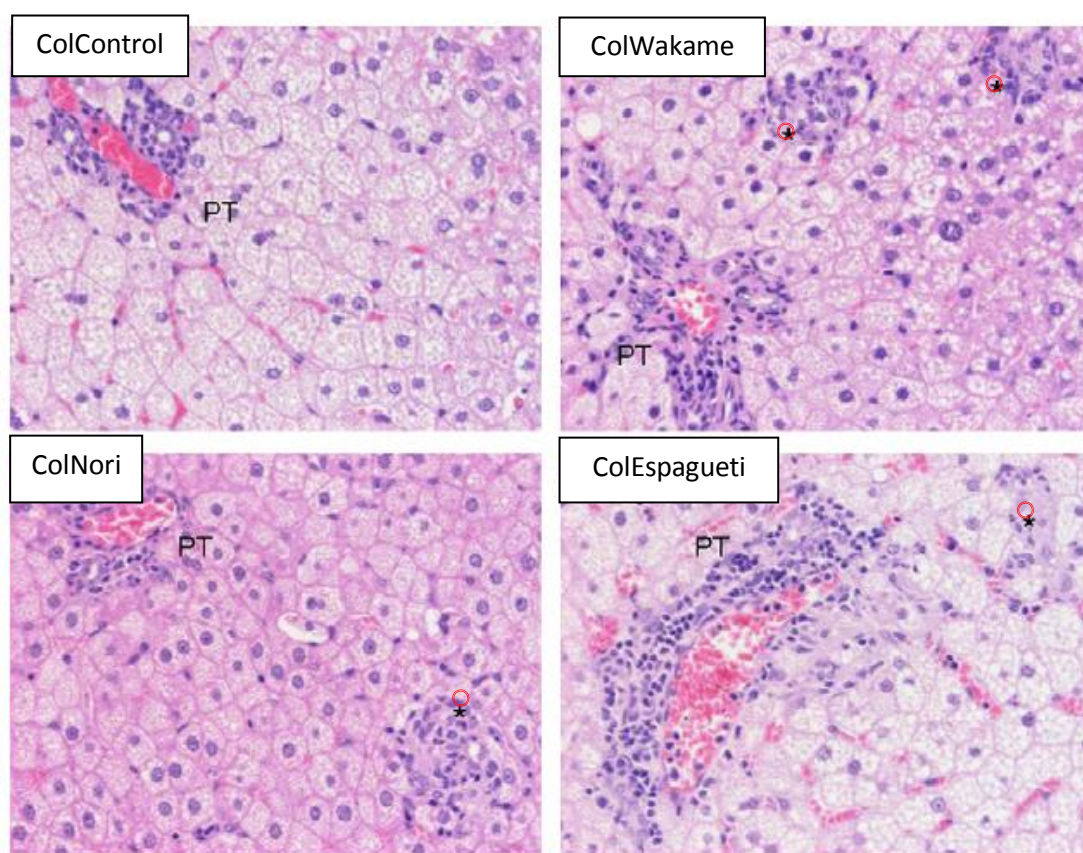


**Figura 26. Estudio histológico del hígado** de ratas alimentadas con los cárnicos reestructurados (RC) control; Wakame; Nori, y Espagueti de Mar. (→) Degeneración vacuolar hidrópica. PT: Triada portal. Tinción hematoxilina-eosina (x 20).

Sin embargo, se encontró una degeneración hidrópica significativa, principalmente en la zona centrolubulillar, en los animales que recibieron las dietas Nori y Espagueti de Mar, mientras que se observaron incrementos ligeros, pero significativos de agregados linfoides a nivel portal en el grupo que recibió la dieta Wakame (Figura 26). Bocanegra y cols., (2003) observaron vacuolas no densas de tipo glucógeno en el citoplasma de hepatocitos de ratas alimentadas con Nori, pero no en los de ratas que consumieron Konbu. Estas diferencias se relacionaron con el tipo de fibra de ambas algas y con diferencias en la absorción de glucosa. A este respecto, datos de esta Tesis Doctoral que han sido enviados a la revista BMC Complementary Alternative Medicine

sugieren que extractos acuosos, clorofórmicos y etanólicos de Wakame, Nori y Espagueti de Mar inducen diferentes efectos en la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa y en la difusión de glucosa través de membrana (ver apartado 6.7).

En los animales que consumieron dietas con agente hipercolesterlemiante se observó un incremento de lípidos intracitoplasmáticos junto a infiltración leucocitaria marcada en los espacios periportales que sugieren importante inflamación. También los focos necro-inflamatorios encontrados fueron mucho más abundantes en los grupos que recibieron dieta adicionada de colesterol que en sus respectivos controles sin colesterol (Figura 27).



**Figura 27. Estudio histológico del hígado** de ratas alimentadas con las dietas conteniendo reestructurados cárnicos y enriquecidas en colesterol. (\*) Agregados multifocales necro-inflamatorios. Nótese la marcada infiltration periportal y la degeneración grasa con abundantes vacuolas grasas intracitoplasmáticas. Las vacuolas y los “cistos” grasos fueron mayores en los grupos ColWakame y Col Espagueti de Mar que en las ColControl y ColNori. Tinción hematoxilina-eosina

De acuerdo con otros estudios (Bocanegra y cols., 2006, 2008; Fukushima y cols., 2001; Sánchez-Muniz y cols., 2003) la suplementación con colesterol dietético

resultó en hepatomegalia, esteatosis e incremento del índice hepatosomático de las ratas (Bocanegra y cols., 2003, 2006; <sup>a</sup>Sánchez-Muniz y cols., 1992, 1996). El RC con algas fue incapaz de reducir la hepatomegalia inducida por el colesterol de la dieta. Se observaron incrementos de agregados linfoides periportales en todos los grupos que recibieron dieta suplementada con colesterol. Aunque los constituyentes celulares de los agregados son linfocitos, también se observaron en los sinusoides pequeño número de neutrófilos en los nuevos focos necróticos. Inesperadamente, los RC con algas no disminuyeron el daño del hígado inducido por la dieta ColControl. Bocanegra y cols., (2003, 2006) encontraron una disminución de la infiltración grasa en ratas suplementadas con 7% de Nori, pero el suplemento con Konbu fue inefectivo. Estos resultados pueden deberse a diferencias en el diseño experimental (duración de los experimentos, concentraciones de las algas, y la inclusión o no de RC en la dieta). En todos los grupos que consumieron dietas a las que se añadió colesterol, principalmente en los grupos ColNori y ColEspagueti de Mar, se observó colestasis y daño hepatocelular, aunque no hubo hiperplasia de los ductos biliares. También el incremento de las enzimas ALT y AST parece señalar la existencia de colestasis y daño hepático.

Puede hipotetizarse que la disminución de colesterolemia en los grupos que han recibido la dieta ColNori y ColEspagueti es debida a la disminución de la síntesis de  $\beta$ -VLDL como se ha comentado (p.e. en los artículos publicados en British Journal of Nutrition y el pendiente de aceptación en Journal of Medicinal Foods) e implicaría que grandes cantidades de colesterol estarían dispuestas a incorporarse en la bilis, contribuyendo a la deposición del colesterol en los ductos biliares y a la colestasis observada. También se ha observado degeneración grasa en todos los grupos suplementados con el colesterol (**Figura 27**). Algunos animales mostraron lipogranulomas multifocales y números variado de células macrófagicas multinucleadas conteniendo gotitas de grasa. Cerca de la vena centrolobulillar, los hepatocitos aparecen menos alterados y vacuolizados, y la presencia de megalocitos y mitosis fue más frecuente en esta zona. Los hígados de las ratas alimentadas con las dietas ColNori y ColEspagueti de Mar tienden, aunque no significativamente, a demostrar mayor número de mitosis que las ratas alimentadas con la dieta ColC. López-Varela y cols. (1995) demostraron que hígados con alta incidencia de mitosis también tenían incrementado el TBARS, lo que coincide con los datos de esta Tesis Doctoral.

El CYP4A-1 es considerado un marcador de capacidad de detoxificación del hígado, ya que se incrementa después de la ingestión de xenobióticos (Pan y cols.,



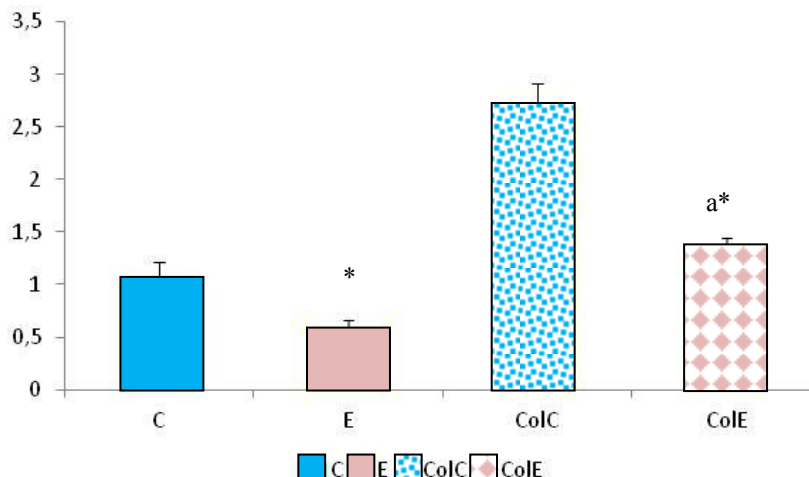
2002). Sin embargo, los ácidos grasos, los eicosanoides y algunas drogas hipolipemiantes como el clofibrato son los principales sustratos para CYP4A1 (Santiago y cols., 2002). En esta Tesis Doctoral, los grupos que recibieron las dietas Nori y Espagueti de Mar incrementaron la expresión génica de la CYP4A1 respecto al grupo Control. Como ya se comentó, las algas son ricas en polifenoles y elementos traza, y contienen niveles moderados de AGP que podrían explicar parcialmente los resultados de la expresión génica de la CYP4A1. Sin embargo, estos efectos se pierden cuando la dieta se suplementa con colesterol. Orolin y cols. (2009) encontraron una disminución en la expresión génica de la CYP4A1 en ratas Wistar-Kyoto alimentadas con colesterol. La delta-6 desaturasa es una enzima clave que controla la síntesis de los ácidos grasos de cadena muy larga a partir de los ácidos grasos madre (p.e. linoleico y linolénico). Esta actividad enzimática es inhibida por la hipercolesterolemia (Das, 2006) explicando, al menos en parte, la disminución de la expresión génica de CYP4A1 observada en los grupos ColWakame, ColNori y ColEspagueti de Mar. De acuerdo con otros estudios (Sánchez-Muniz y cols., 1992, 1996), los marcadores de daño hepático se incrementan después del consumo de colesterol. Paradójicamente, las dietas más reductoras de la colesterolemia (ColNori y ColEspagueti de Mar) incrementaron los niveles de ALT y AST, sugiriendo la existencia de daño hepatocelular en estos animales. Puede especularse que los marcadores de daño hepático pueden estar relacionados con la pérdida de protección vía CYP4A1 en los grupos que han consumido las dietas ColNori y ColEspagueti de Mar vs. Nori y Espagueti de Mar, respectivamente; pero en menor cuantía en las que consumieron las dietas ColControl y ColWakame respecto a sus respectivos basales. Estos hechos pueden corroborarse en la Figura 27 y demuestran que el daño hepatocelular tiende a ser más elevado en los grupos que recibieron las dietas ColNori y ColEspagueti de Mar que los que ingirieron las dietas ColControl y ColWakame.

### **6.5. Efectos del consumo de reestructurados cárnicos con algas y del colesterol dietético sobre las enzimas lipogénicas y lipolíticas del tejido adiposo.**

En este trabajo, publicado en la revista Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics se presenta por primera vez en la literatura científica la expresión de genes implicados en la lipogénesis y la lipólisis del tejido adiposo de ratas alimentadas con dietas enriquecidas o no en agente hipercolesterolemia y CR conteniendo algas. Se ha demostrado que la incorporación de Espagueti de Mar al cárnico reestructurado

disminuye el efecto altamente lipolítico del colesterol interaccionando en la expresión de enzimas lipogénicas y lipolíticas del tejido adiposo.

La **Figura 28** muestra las diferencias en los valores de ARNm para HSL para los diferentes grupos estudiados.



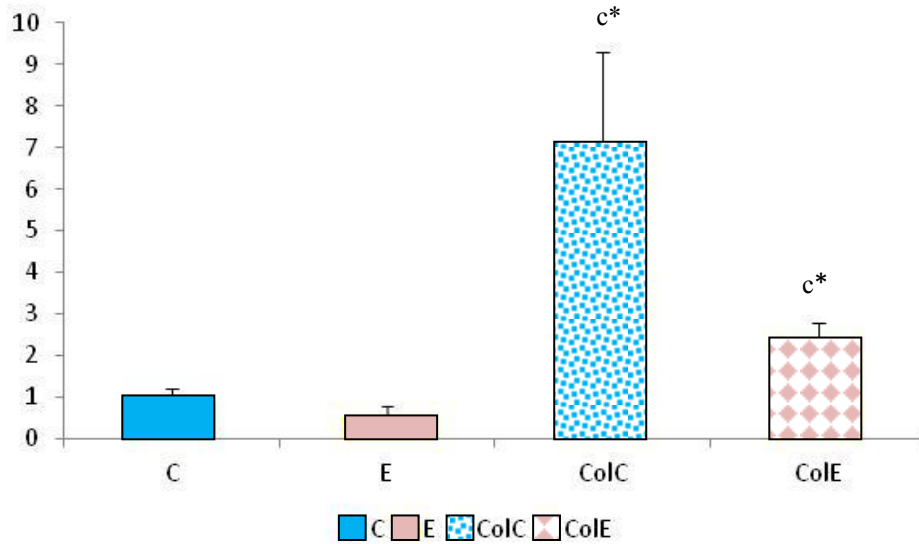
**Figura 28. Expresión génica de la Lipasa sensible a hormonas (HSL) en los grupos experimentales consumiendo reestructurados cárnicos (RC).** C, RC Control; E, RC con Espaguete de Mar; ColC, RC control y colesterol más ácido cólico; ColW, ColE, RC con Espaguete de Mar y colesterol más ácido cólico. No se encontró interacción significativa del tipo de reestructurado cárnico con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (E vs C ó ColE vs. ColC) se señalan mediante una letra (a  $p < 0,05$ ). El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p < 0,05$ ).

La incorporación de colesterol en la dieta (ColC y ColE) aumentó la expresión de ARNm de HSL, lo que sugiere una actividad lipolítica incrementada. Los grupos que consumieron cárnicos con Espaguete de Mar (E y ColE) expresaron menos HSL que sus homólogos Control y ColControl, respectivamente. No hay una explicación clara para estos resultados, teniendo en cuenta la activación lipolítica que ejercen los florotaninos (Jormalainen y Honkanen, 2004; Ragan y Glombitza, 1986; Koivikko y cols., 2008). Según Lasa y cols., (2012) el resveratrol incrementa la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo epididimal de ratones viejos y de ratones *knockout*. La disminución en la expresión de HSL en las ratas que consumen cárnicos reestructurados con Espaguete de Mar revela que la lipólisis está disminuida como mecanismo de compensación para evitar pérdidas excesivas de peso. De hecho, el cociente de las expresiones génicas de la LPL y HSL, utilizado como cociente adipogénico/adipolítico, en el grupo control tuvo el valor de 1, mientras que en el grupo que consumió Espaguete de Mar fue 1,8. Sin embargo, la utilidad de este cociente deberá ser confirmado en futuros trabajos.

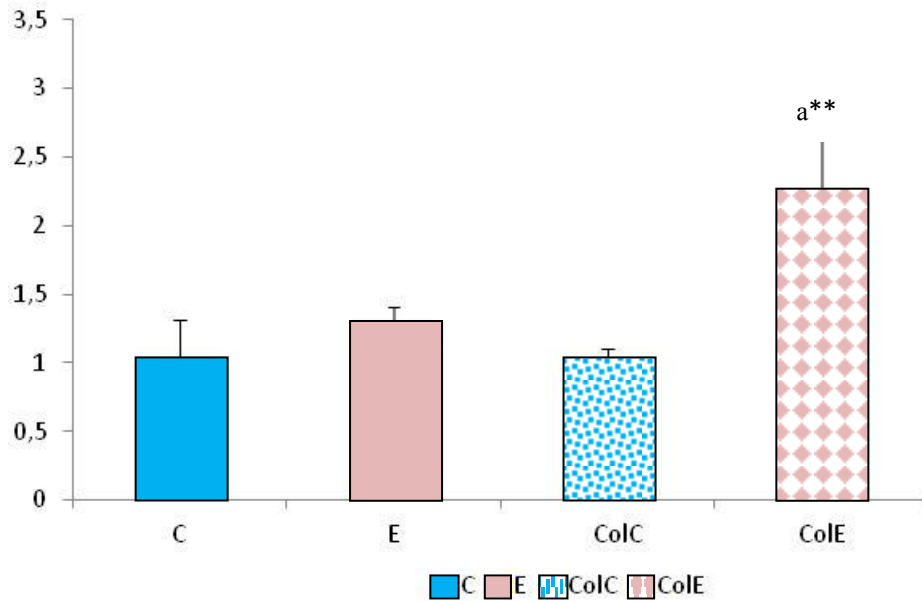


El colesterol añadido a la dieta parece incrementar la lipólisis en el adipocito, como se sugiere por los niveles tres veces más elevados de ARNm HSL y la disminución de la grasa corporal (50%) y del contenido de grasa del tejido adiposo (40%) en estos animales. El efecto del colesterol dietético en la expresión de HSL en el grupo ColControl está probablemente relacionado con la regulación del colesterol plasmático, dada la correlación significativa encontrada entre estos dos parámetros. Se ha propuesto que la esterificación del colesterol hepático es un importante mecanismo de control de la colesterolemia (Daumerie y cols., 1992; Fielding, 1992). Durante el estadio interprandial se produce movilización de los ácidos grasos de los triglicéridos del tejido adiposo al hígado (Connor y cols., 1996). Este mecanismo mejora la esterificación del colesterol en el hígado. El descenso de la expresión génica de HSL en el grupo que consume el agente hipercolesterolemizante junto al RC conteniendo Espagueti de Mar frente a aquellas que ingieren el agente hipercolesterolemizante junto con el RC control puede ser una consecuencia de una menor demanda de ácidos grasos necesarios para la esterificación del colesterol en el hígado, ya que en este grupo se reduce la colesterolemia, lo cual podría paliar la pérdida excesiva de peso corporal, de peso y de la grasa del tejido adiposo.

El consumo del cárnico reestructurado con alga no modificó la expresión génica de las enzimas FAS y ACC debido a la disminución de la ingesta, ganancia de peso y grasa del tejido adiposo (**Figuras 29 y 30**). Sin embargo, la dieta hipercolesterolemizante incrementó la expresión génica de FAS, pero no la de ACC, mientras que la dieta con Espagueti de Mar aumentó la expresión génica de ACC pero no de FAS (Figuras 30 y 29, respectivamente). La enzima ACC es una enzima limitante que participa como primer paso en la síntesis de ácidos grasos, dando lugar a malonil-CoA, mientras que la enzima FAS transforma malonil-CoA en palmitil-CoA (Nelson y Cox, 2000). El exceso en la síntesis *de novo* de ácidos grasos reduce la expresión génica de ACC (Nelson y Cox, 2000). Por tanto, parece evidente que los grupos de ratas ColC y ColE tienden a incrementar la biodisponibilidad de los ácidos grasos, pero través de diferentes mecanismos (expresión génica de ACC o FAS).



**Figura 29. Niveles de la expresión génica de la síntasa de ácidos grasos (FAS).** Dietas: Control (C), Espagueti de mar (E), ColC (RC control y colesterol añadido), ColE (RC con alga Espagueti de mar y colesterol). No se encontró interacción significativa del tipo de reestructurado cárnico con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (E vs C ó ColE vs. ColC) se señalan mediante una letra (c  $p < 0,001$ ). El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\* $p < 0,05$ ).



**Figura 30. Niveles de la expresión génica de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC).** Dietas: Control (C), Espagueti de mar (E), ColC (RC control y colesterol añadido), ColE (RC con alga Espagueti de mar y colesterol). No se encontró interacción significativa del tipo de reestructurado cárnico con la adición de colesterol dietético. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) debidas al tipo de alga añadido al RC (E vs C ó ColE vs. ColC) se señalan mediante una letra (a  $p < 0,05$ ). El efecto del colesterol (ColC vs. C; ColE vs. E) se indica con asteriscos (\*\* $p < 0,01$ ).

Como se ha comentado previamente, el aumento en la expresión génica de FAS evita la depleción de la grasa del tejido adiposo en los animales hipercolesterolémicos; por lo que una reducción en la expresión génica de FAS, debido al consumo del alga en ratas hipercolesterolémicas, puede ser balanceada por un incremento en la expresión de

ACC. Los AGP omega-3 reducen la expresión génica de FAS en el tejido adiposo (Raclot y cols., 1997). El Espagueti de Mar, posee en su grasa un 20-50% de AGP (Bocanegra y cols., 2009), lo que podría contribuir a la reducción de la expresión génica de FAS.

#### **6.6. Efectos del consumo a corto plazo de dietas enriquecidas en colesterol y reestructurados cárnicos sobre el ciclo celular y la apoptosis**

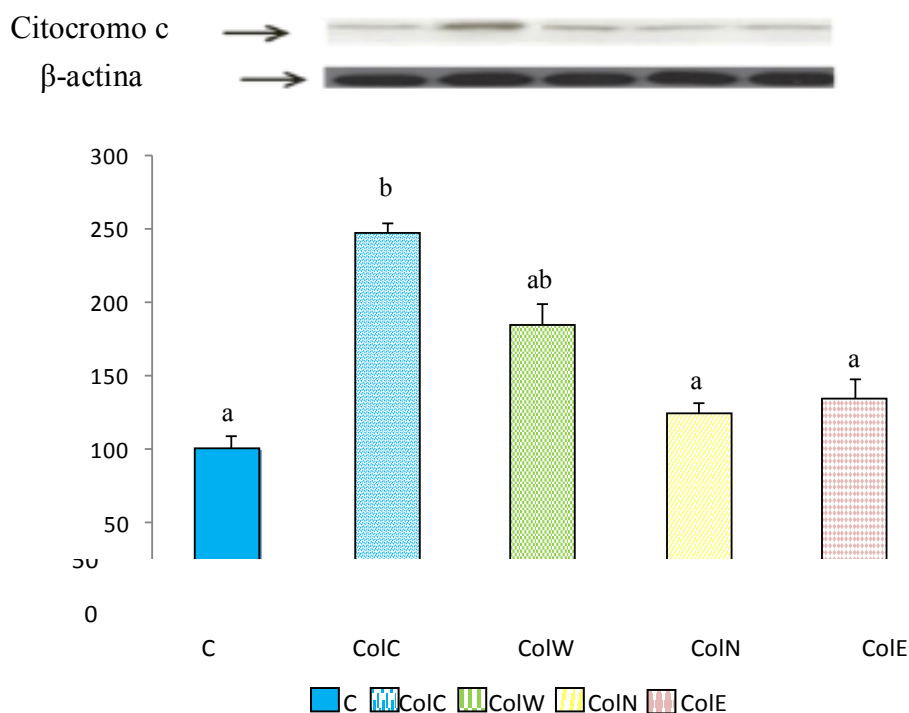
En la revista Nutrición Hospitalaria hemos mostrado por primera vez en bibliografía internacional los efectos del consumo de productos cárnicos reestructurados con algas, como parte de una dieta enriquecida con colesterol, sobre el ciclo celular y la apoptosis en ratas Wistar.

La homeostasis en los organismos se logra gracias a un balance entre la división y la muerte celular. El proceso de necrosis-regeneración se caracteriza por un cambio en la distribución de las distintas poblaciones de hepatocitos, ya que mientras los hepatocitos normales presentan una estabilidad en cuanto a su contenido en ADN y organización cromosómica, los hepatocitos en regeneración se encuentran involucrados en el proceso de proliferación a través del ciclo de división celular. Éste incluye la síntesis programada del ADN para duplicar el material genómico de la célula antes de su división.

En el grupo de ratas que consumen la dieta control enriquecida en el agente hipercolesterolemizante se produce un incremento en la población de hepatocitos con dotación cromosómica diploide en el momento de la necrosis (73,0% - 78,6%), que tiende a disminuir con la administración de las algas. Particularmente en el grupo de ratas que consumen dietas enriquecidas en colesterol y reestructurados cárnicos con Espagueti de Mar se alcanzan valores similares a los de ingerir dieta control sin colesterol.

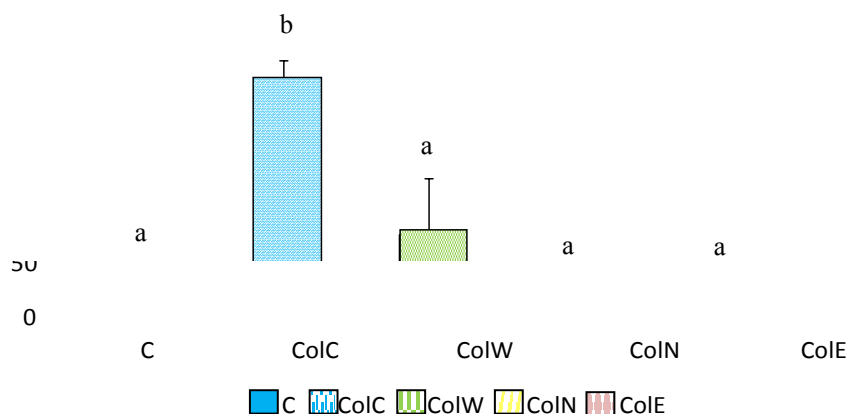
La dieta control enriquecida en colesterol incrementó significativamente la apoptosis frente a la control a la que no se añadió dicho esterol. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Zamora y cols. (2005), que indican que el colesterol dietético incrementa la apoptosis. El consumo de cárnicos con algas, fundamentalmente Nori redujo la actividad de la caspasa-3 aumentada por la dieta hipercolesterolemizante. Así, atendiendo a los resultados de apoptosis y ADN celular, la inclusión de algas a los reestructurados cárnicos indujo efectos antiapoptóticos, principalmente en el grupo de dieta enriquecida en colesterol y alga Nori.

El estrés oxidativo tiene su origen a partir del desequilibrio entre los radicales libres generados en los procesos metabólicos del organismo y la disminución de los sistemas antioxidantes. Las alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial causan liberación de radicales libres y citocromo c. Una vez que el citocromo c es liberado en el citosol, se une a otra proteína, la Apaf-1, y proporciona la activación de la cascada de las caspasas, dando lugar a la apoptosis, lo cual es también apoyado por el contenido de ADN del ciclo celular (Tien y cols., 2011). En el grupo con dieta control enriquecida en colesterol los niveles citosólicos del citocromo c y la activación de la caspasa-3 fueron mucho más elevados que en el grupo control sin colesterol. Eso indica que la liberación del citocromo c en el citosol es debida al daño en la membrana mitocondrial, producido por el incremento de los niveles de radicales libres que induce la elevación de colesterol. Los niveles elevados del citocromo c disminuyeron por el consumo de algas fundamentalmente en los grupos que recibieron colesterol en sus dietas y Nori o Espagueti de Mar (**Figura 31**).



**Figura 31. Niveles de expresión génica del citocromo c** (unidades arbitrarias) después de una semana de consumir dietas conteniendo reestructurado cárnico (RC) control (C); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC control (ColC); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC con alga Wakame (ColW), Nori (ColN) y Espagueti de Mar (ColE). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos se señalan mediante letras distintas.

Las algas tienen componentes con actividad antioxidante que probablemente puedan mejorar los perfiles lipídicos en modelos experimentales reduciendo el colesterol plasmático. Algunos aminoácidos y otras moléculas (por ejemplo el zinc) presentes en algas rojas y marrones (Rupérez y cols., 2002), han demostrado no sólo actividad antioxidante sino también propiedades antiapoptóticas (Zamora y cols., 2005).

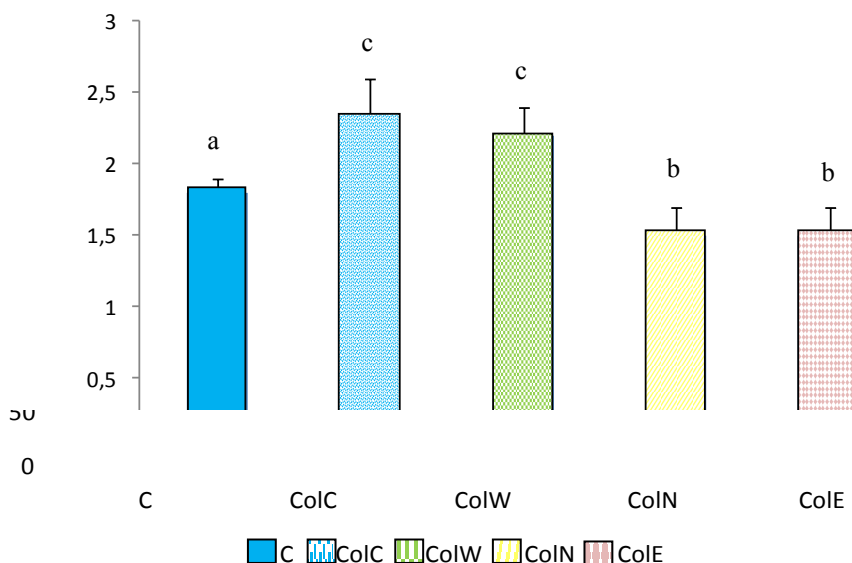


**Figura 32. Niveles de actividad de la caspasa-3** (unidades/mg de proteína) después de una semana de consumir dietas conteniendo reestructurado cárnico (RC) control (C); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC control (ColC); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC con alga Wakame (ColW), Nori (ColN) y Espagueti de Mar (ColE). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos se señalan mediante letras distintas.

También las vitaminas A y E, y pequeñas cantidades de AGP omega-3 presentes en las algas (Bocanegra y cols., 2009) presentan propiedades antioxidantes y muy posiblemente efectos antiapoptóticos. La fucosa y polisacáridos sulfatados extraídos de las especies *Sargassum sp.* y *Fucus vesiculosus* inhiben *in vitro* el crecimiento y la apoptosis de células de melanoma B<sub>16</sub> (Ale y cols., 2011a; Ale y cols., 2011b). Thiruchenduran y cols. (2011) mostraron que los incrementos de la expresión de la caspasa-3 y del citocromo c, observados en animales alimentados con una dieta rica en colesterol, fueron parcialmente bloqueados por la proantocianidina aislada de semillas de uva al reducir, directa o indirectamente, la producción de radicales libres. Mohamed y cols., (2012) observaron que el consumo de algunas algas disminuye la oxidación lipídica *in vivo*. Así, los niveles de malondialdehído, marcador de peroxidación lipídica, se redujo en el hígado, corazón y cerebro de animales viejos por la administración de porfiranos y galactanos sulfatados de la *Porphyra spp.* Es probable que el consumo de Nori y Espagueti de Mar en dietas enriquecidas en colesterol disminuya los radicales libres debido a la capacidad antioxidante de algunos de los componentes de estas algas,

manteniendo así la permeabilidad de la membrana, para así reducir el daño tisular o la apoptosis. Sin embargo, actualmente no se conocen completamente los mecanismos reales que intervienen en la capacidad antiapoptótica de las algas.

No debe olvidarse que en los grupos que consumieron a corto plazo reestructurados cárnicos adicionados con agentes hipercolesterolemiantes, la inclusión de Nori y Espagueti de Mar produjo elevaciones de la colesterolemia significativamente menores que de Wakame o del cárnico control (**Figura 33**). Este, aspecto que debe repercutir en los efectos antioxidantes de estas dietas, ya que como veremos más adelante la eliminación de colesterol vía biliar implica producción de radicales libres.



**Figura 33. Niveles de colesterol plasmático** (mmol/L) después de una semana de consumir dietas conteniendo reestructurado cárnico (RC) control (C); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC control (ColC); dietas con agentes hipercolesterolemiantes y RC con alga Wakame (ColW), Nori (ColN) y Espagueti de Mar (ColE). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos se señalan mediante letras distintas.

### 6.7. Efectos *in vitro* de extractos de algas sobre dos etapas de la digestión y absorción de hidratos de carbono

En este estudio enviado a la revista BCM Complementary and Alternative Medicine se han evaluado diferentes extractos (clorofórmico, etanólico y acuoso) de tres algas *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Porphyra umbilicalis* (Nori), e *Himanthalia elongata* (Espagueti de Mar) sobre la digestión y absorción de hidratos de carbono. La  $\alpha$ -glucosidasa es una enzima con una importante función en la digestión de los hidratos de carbono. Su inhibición es considerada una estrategia adecuada para el tratamiento de la hiperglicemia postprandial, frecuentemente asociada con la diabetes tipo II (Serrano Ríos y Gutiérrez Fuentes, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que el extracto

acuoso de Espagueti de Mar, podría ser utilizado como antihiper glucémico al inhibir la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa. La explicación de los efectos de los extractos de las algas en la digestión de los hidratos de carbono y el movimiento de la glucosa a través de la membrana de diálisis, se ha basado en su diferente composición (**Tabla 11**) (Cofrades y cols., 2010).

**Tabla 11.** Composición aproximada de fibra dietética, contenido de polifenoles y propiedades físico-químicos de Wakame, Nori y Espagueti de Mar

	Wakame	Nori	Espagueti de Mar
<b>Polifenoles (g/100g ms)</b>	4,5 <sup>1</sup>	5,5 <sup>1</sup>	23,5 <sup>1</sup>
<b>Cenizas totales (g/100g, ms)</b>	37 <sup>1</sup>	30 <sup>1</sup>	12 <sup>1</sup>
<b>Proteína (g/100g, ms)</b>	11,2 <sup>1</sup>	36,5 <sup>1</sup>	4,8 <sup>1</sup>
<b>Fibra total (g/100g, ms)</b>	42 <sup>1</sup>	37 <sup>1</sup>	51 <sup>1</sup>
<b>Fibra soluble (g/100g, ms)</b>	14 <sup>1</sup>	22 <sup>1</sup>	25 <sup>1</sup>
<b>Capacidad de hinchamiento (mL/g, ms)</b>	10,53 <sup>2</sup>	6,08 <sup>2</sup>	10,97 <sup>3</sup>
<b>Capacidad de retención de agua (g/g, ms)</b>	10,96 <sup>2</sup>	5,12 <sup>2</sup>	7,26 <sup>3</sup>
<b>Capacidad de retención de aceite (g/g, ms)</b>	0,96 <sup>2</sup>	1,04 <sup>2</sup>	1,61 <sup>2</sup>

ms, materia seca; <sup>1</sup>Cofrades y cols. (2010); <sup>2</sup>Rupérez y Saura-Calixto (2001); <sup>3</sup>Gómez-Ordóñez y cols. (2010).

El alga Espagueti de Mar es rica en fibra soluble y ácidos urónicos, y pobre en minerales. Debido a la propiedad de hidrosolubilidad de su fibra, la capacidad de hinchamiento es también muy elevada, mientras que la capacidad de retención de aceite es baja (Gómez-Ordóñez y cols., 2010). Al contrario, Wakame contiene poca fibra soluble, pero un alto contenido de minerales y posee alta capacidad de retención de agua (Rupérez y Saura-Calixto, 2001). Nori posee valores intermedios de polifenoles, cenizas totales, fibra soluble y capacidad de retención de agua; sin embargo, destaca su alto contenido en proteína y menor capacidad de hinchamiento (Rupérez y Saura-Calixto, 2001).

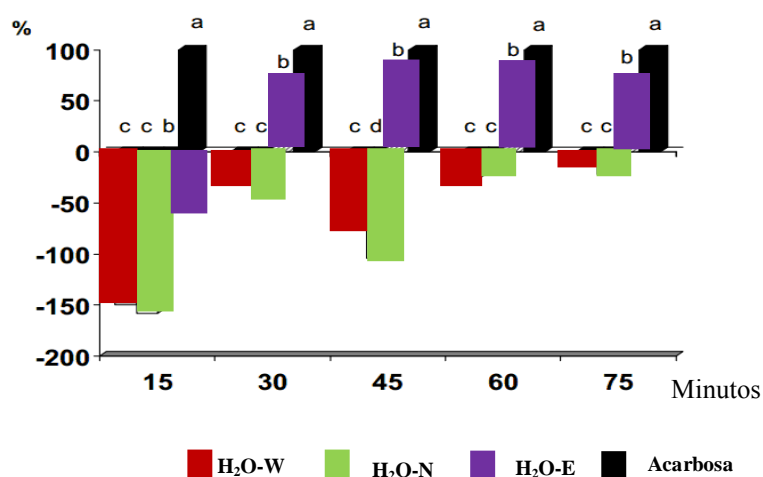
Varios estudios han demostrado que las propiedades antidiabéticas de las algas son debidas a los efectos de los polifenoles y en particular de los fluorotaninos sobre la digestión de los hidratos de carbono. Los extractos metanólicos de *Ecklonia stolonifera*



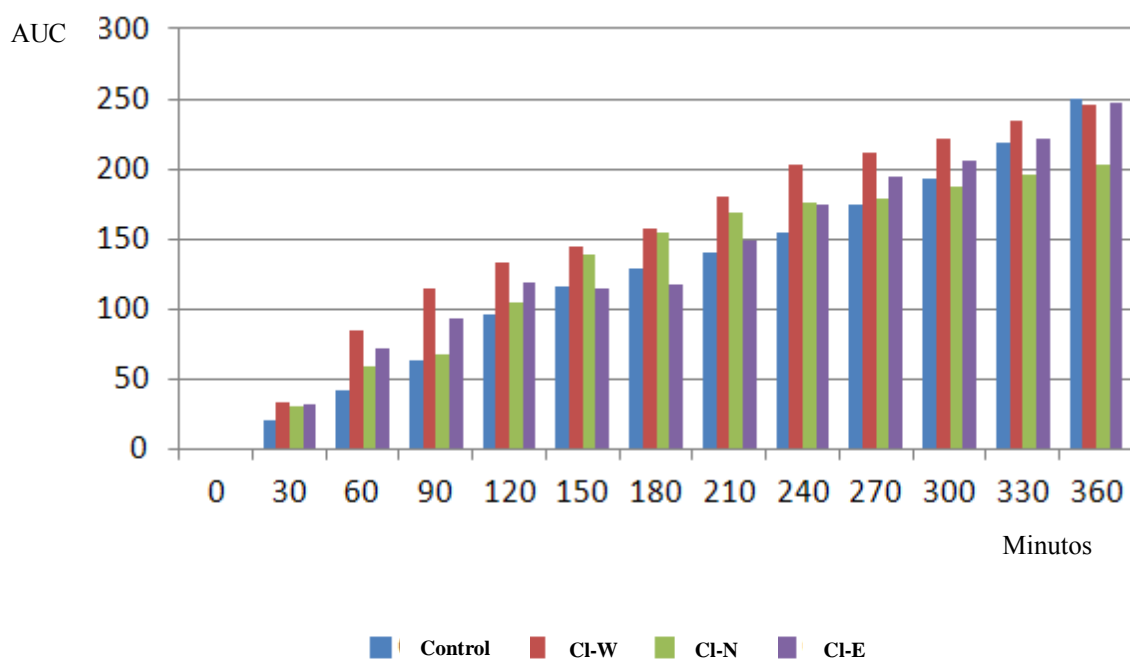
y *Eisenia bicyclis*, y los florotaninos aislados, presentan potente acción inhibitoria de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa (Li y cols., 2011; Thomas y Kim, 2011), mientras que los aislados de *Ascophyllum nodosum* han demostrado efectos antidiabéticos al inhibir tanto las actividades  $\alpha$ -glucosidasa como  $\alpha$ -amilasa (Nwosu y cols., 2011).

También se ha sugerido que la fibra soluble puede influir en la inhibición de las enzimas digestivas del almidón (Kim, 2011). El alga Espagueti de Mar, rica en fibra soluble, presenta unos fucooidanos con estructura similar a los fucooidanos de *Ascophyllum*, que tienen actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa (**Figura 34**) (Li y cols., 2008). Además, la correlación entre fibra soluble y polifenoles solubles no debe ser descartada, ya que ambos son componentes esenciales de las algas (Jiménez-Escrig y Sanchez Muniz, 2000).

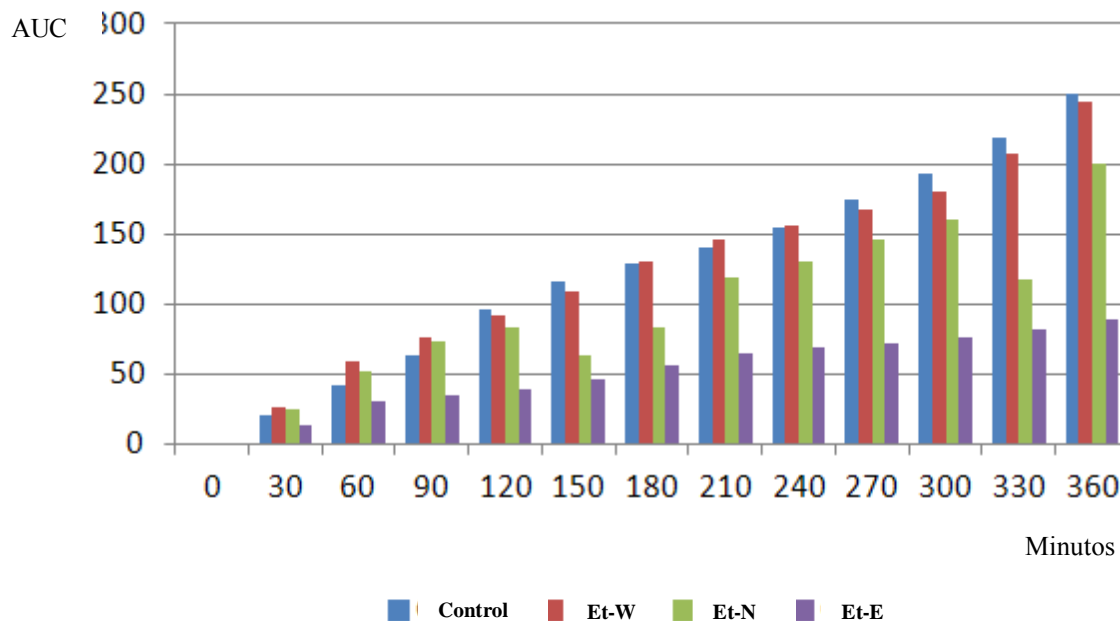
Algunos extractos de algas marinas y diversos polisacáridos solubles producen una disminución de la absorción intestinal de glucosa, la cual no es debida a cambios en el metabolismo intestinal, sino a una reducción de la tasa de vaciamiento gástrico, lo cual podría explicar el mecanismo de acción relacionado con el efecto antihiper glucémico de las algas (Edwards y cols., 1987; Jenkins y cols., 2000). También, diversos estudios han demostrado el efecto de algunos extractos de algas en modelos de difusión de la glucosa (Gallagher y cols., 2003). No obstante, nuestro trabajo es el primero que investiga extractos de Espagueti de Mar. Se ha observado una modificación de la difusión de la glucosa a través de la membrana con todos los extractos. El extracto etanólico de Espagueti de Mar y el extracto acuoso de Wakame (**Figuras 34-36**) son los que han demostrado un mayor efecto en inhibir la difusión de la glucosa comparados con el control; sin embargo el extracto acuoso de Espagueti de Mar incrementó la tendencia a la difusión. Los resultados obtenidos y el análisis estadístico tipo Componentes Principales, señalan que los efectos inhibitorios sobre la maltasa o sobre la difusión de la glucosa son independientes y no superponibles, por lo que cualquier generalización debe ser evitada.



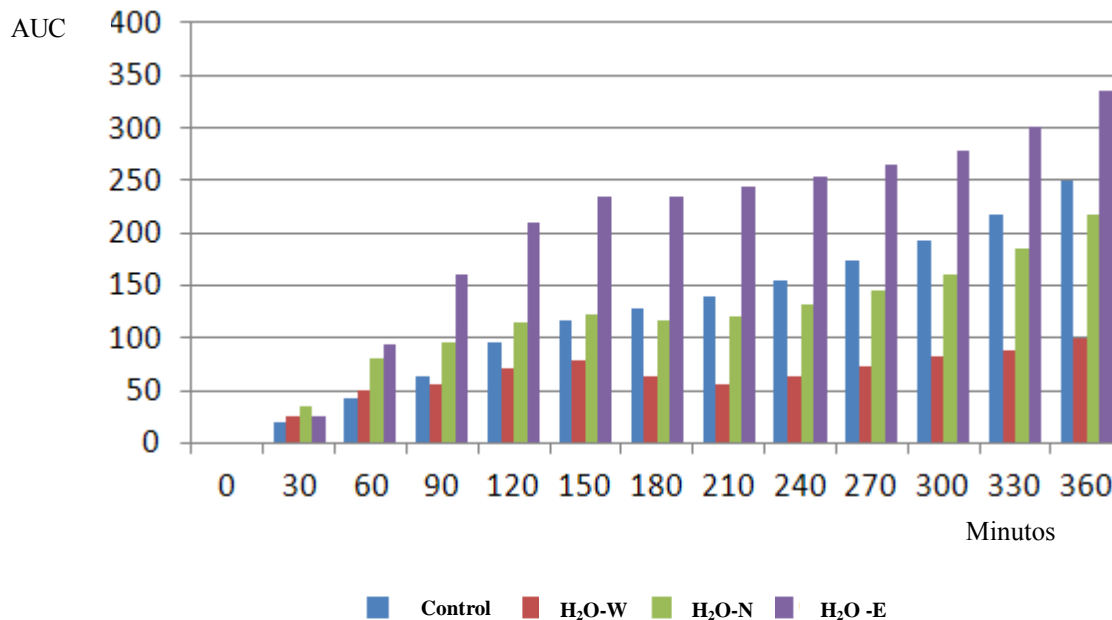
**Figura 34. Efectos de los extractos acuosos obtenidos de las algas marinas sobre la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa.** H<sub>2</sub>O-W, extracto acuoso de Wakame; H<sub>2</sub>O-N, extracto acuoso de Nori; H<sub>2</sub>O-E, extracto acuoso de Espagueti de Mar.



**Figura 35. Efectos de los extractos clorofórmicos obtenidos de las algas marinas sobre la difusión de la glucosa.** Cl-W, extracto clorofórmico de Wakame; Cl-N, extracto clorofórmico de Nori; Cl-E, extracto clorofórmico de Espagueti de Mar. AUC, área bajo la curva.



**Figura 36. Efectos de los extractos etanólicos obtenidos de las algas marinas sobre la difusión de la glucosa.** Et-W, extracto etanólico de Wakame; Et-N, extracto etanólico de Nori; Et-E, extracto etanólico de Espagueti de Mar. AUC, área bajo la curva.



**Figura 37. Efectos de los extractos acuosos obtenidos de las algas marinas sobre la difusión de la glucosa.** H<sub>2</sub>O-W, extracto acuoso de Wakame; H<sub>2</sub>O-N, extracto acuoso de Nori; H<sub>2</sub>O-E, extracto acuoso de Espagueti de Mar. AUC, área bajo la curva.

## 6.8. DISCUSIÓN INTEGRADORA

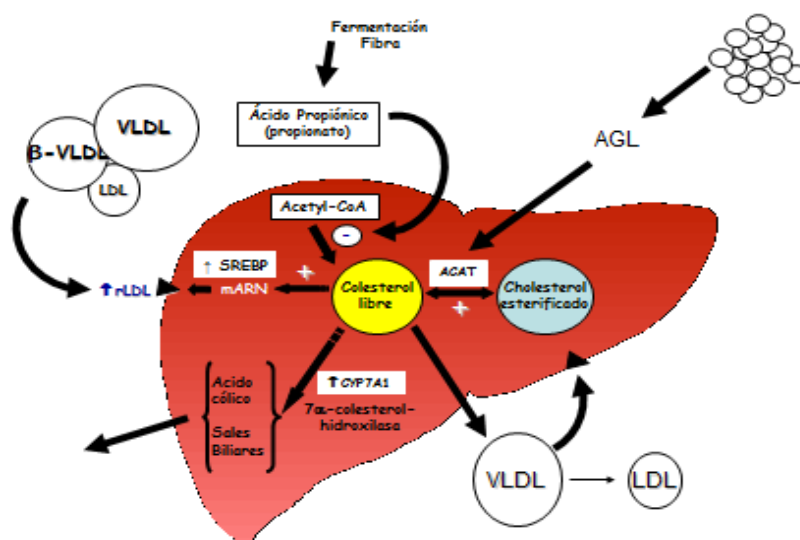
En los apartados de la discusión 6.1 a 6.7, se han expuesto de forma detallada diferentes aspectos a fin de responder a los objetivos planteados.

En esta sección pretendemos integrar los efectos ya discutidos individualmente considerando los posibles efectos de la ingesta de RC conteniendo algas sobre a) crecimiento y b) estructura de diferentes órganos, en particular del hígado. También observar los efectos sobre c) la expresión del enzima CYP7A1 como índice de transformación del colesterol en ácido cólico, d) del nivel de colesterol hepático, e) de la expresión y nivel del sistema glutatión y de enzimas antioxidantes, f) del nivel y perfil lipoproteico y actividad del enzima antioxidante arilesterasa.

Estos aspectos se discutirán de nuevo al incluir en la dieta colesterol y ácido cólico observando además a nivel hepático los posibles efectos antiapoptóticos a corto plazo de las dietas elaboradas con RC conteniendo algas y los efectos moduladores de la expresión génica de enzimas lipogénicos y lipolíticos a nivel de tejido adiposo que puedan explicar los efectos sobre el peso corporal del consumo de este tipo de dietas y la modulación de los dos *pooles* teóricos de colesterol.

Con la finalidad de acercarnos a los mecanismos moleculares de los RC con algas se han estudiado algunos aspectos de la composición de las algas y sus efectos sobre algunos aspectos centrales de la digestión de hidratos de carbono.

Las dietas conteniendo RC con algas, pero no enriquecidas en colesterol son bien aceptadas y propulsan crecimientos y ganancias de peso adecuados, aunque tienen pocos efectos en términos generales sobre la mayoría de los objetivos planteados. No obstante tienden a elevar la expresión génica del CYP7A1 señalando claramente un efecto potencial para reducir el nivel de colesterol libre hepático y mantener efectiva la síntesis de ácido cólico y la expresión y actividad de receptores para lipoproteínas (**Figura 38**). De hecho el reestructurado cárnico con Espaguete de Mar seguido por el de Nori, eleva la expresión de la isoforma 7A1 del citocromo P450 y contribuye a mantener muy elevados los niveles de HDL y reducidos los de VLDL y LDL. La potencialidad antioxidante de las dietas con cárnicos y algas, mantiene en términos generales lo observado en otra tesis anterior y publicado en diferentes revistas, al suplementar las dietas con algas, pero no con reestructurados cárnicos (Bocanegra y cols., 2003; Bocanegra y cols., 2009).



**Figura 38.** Esquema resumen de los mecanismos que regulan la síntesis y excreción de colesterol. Nótese la conversión entre los *pools* de colesterol libre y esterificado, la captación de lipoproteínas por receptores y la formación de ácido cólico. ACAT, acil-colesterol-acil-transferasa; AGL, ácidos grasos libres; CYP7A, isoforma 7A del citocromo P450; LDL, lipoproteínas de baja densidad; rLDL, receptor para LDL; SREBP, factor de transcripción proteína del receptor activada por esteroides; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; β-VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad enriquecidas en colesterol. Fuente: Sánchez-Muniz, modificado de Nus y Sánchez-Muniz (2008) y Sánchez-Muniz (2012).

No obstante, el hierro de la carne debe afectar a los niveles de peroxidación y a la expresión de dicha hemo enzima CYP7A1, ya que el hierro incrementa los niveles de peroxidación lipídica y sin embargo disminuye la expresión de la CYP7A1 (Kamei y cols., 2010). Es de interés señalar, comparando los datos de esta tesis con la de Bocanegra (2009) para el sistema del glutatión y de las enzimas antioxidantes que el uso de RC con algas implicó efectos similares a los del alga aislada sobre el estatus antioxidante. Dado que la isoforma del citocromo P450 produce radicales libres, los efectos antioxidantes observados se deben al sumatorio de las propiedades de las algas, al contenido elevado de hierro, cobre y otros minerales (antioxidantes o prooxidantes) de la carne y de las algas, y a la acción de la isoforma del CYP7A1. En este rompecabezas, la carne con Wakame parece tener mayor efecto antioxidante, evitando la caída de la actividad AE, aunque sus efectos sobre la formación de bilis (vía CYP7A1) sean menores (Figura 21).

La eliminación de posibles compuestos “negativos” parece estar asegurada por la elevación de la expresión génica de otra isoforma del citocromo P450, la enzima CYP4A1. A nivel estructural, el consumo de carne con algas durante 5 semanas no

afecta de manera negativa la forma, tamaño y estructura de las células hepáticas, lo que apoya la “inocuidad” del consumo de este tipo de dietas.

Una visión muy diferente aparece cuando se incluye colesterol y ácido cólico en las dietas. Así, la utilización digestiva y neta de las mismas cambia, ya que los animales presentan menor ganancia de peso y por tanto menores índices de conversión (Figura 38).

El efecto más negativo sobre el peso corporal se manifiesta en el caso de carne con Nori y colesterol. Como consecuencia del consumo de colesterol se produce incremento del colesterol hepático (Schultz Moreira y cols., 2011) que explica el incremento la hepatomegalia observada y la elevación de la expresión de la isoforma CYP7A1, particularmente en los lotes Nori y Espagueti de Mar. Este doble mecanismo debe conducir a disminuir de forma neta el *pool* de colesterol libre o pool regulador, lo que a su vez inducirá expresión elevada de los receptores hepáticos que unen y captan las lipoproteínas aterogénicas (Figura 38). Efectivamente los niveles de lipoproteínas aterogénicas son mucho más bajos y el perfil lipoproteico más normal en las ratas que recibieron dietas con colesterol añadido, pero que contenían carne con Espagueti de Mar o Nori respecto a sus controles. No obstante, los niveles de colesterol en HDL se reducen bastante como consecuencia de una captación elevada de HDL por los receptores *scavenger* B1 hepáticos, contribuyendo a eliminar mayor cantidad de colesterol del plasma vía bilis.

Este control metabólico supone, sin embargo, una carga metabólica de producción de radicales libres que contribuye a reducir la actividad antioxidante de las algas. Así, cuanto mayor es la activación del CYP7A1, mayor el efecto hipocolesterolemiante, pero mayor la producción de radicales libres y por tanto menor el efecto antioxidante.

A diferencia con una tesis anterior de nuestro grupo ya comentada de la Dra Arancha Bocanegra, donde no se incluyó carne pero si algas y colesterol, la dieta Nori no fue capaz de inhibir la infiltración grasa en los hepatocitos. No obstante en aquella tesis el periodo de estudio fue de sólo 3 semanas, mientras que aquí ha sido de 5. También observamos marcada infiltración leucocitaria y otras alteraciones. No tenemos una explicación clara para justificar la diferencia de resultados, pero creemos que la presencia de hierro y otras sustancias, unidas al efecto reductor de la colesterolemia debe inducir peroxidación del colesterol almacenado en el hígado y formación de oxisteroles, los cuales son lesivos para los hepatocitos (Ye y cols., 2013) como se

denota en el estudio histológico (Figura 27). A la elevada infiltración grasa no reducida añadiremos la presencia marcada de infiltrados leucocitarios y la colestasis.

Esta hipótesis de la relación entre colesterolemia y lesión hepática parece confirmarse por los resultados del estudio a corto plazo. Así, mientras los niveles de colesterol mantienen su normalidad (menores de 100 mg/dl), el consumo de RC conteniendo algas (particularmente Nori o Espagueti) anula los efectos proapoptóticos del colesterol (Figuras 31-33). En los estudios de 5 semanas, a pesar de los efectos de las algas, al elevarse los niveles de colesterol, se pierden los efectos protectores. Por tanto parece que existe un nivel de colesterol plasmático en el que el consumo de cárnicos con Nori o Espagueti sería efectivo y más protector.

También con la finalidad de aportar datos referentes a la relación entre ganancia de peso, tejido adiposo y efectos sobre la colesterolemia, se planteó un estudio con la carne con Espagueti de Mar que había manifestado mejores efectos sobre la CYP7A1, el colesterol plasmático y perfil lipoproteico, pero a su vez menor efecto negativo sobre el estatus antioxidante. En estas ratas encontramos una pérdida del incremento de peso respecto a aquellas que recibieron dietas sin colesterol o a las controles con colesterol (Figura 18). Esta reducción del contenido de grasa vendría modulada por un hipotético equilibrio entre la tendencia al incremento de la expresión del enzima LPL, para incrementar la síntesis de grasa, y disminución de la expresión de HSL para evitar la pérdida excesiva de peso y grasa. A tal fin el tejido adiposo liberaría ácidos grasos que llegarían al hígado y elevarían la esterificación del colesterol libre y la expresión de la proteína del receptor para  $\beta$ -VLDL, VLDL y LDL explicando los efectos marcados sobre el perfil lipoproteico (menor cantidad de lipoproteínas aterogénicas) (Figura 38).

Con independencia de lo anterior, el último trabajo presentado en la Tesis sugiere la posible utilidad de algunos extractos de las algas ensayadas como ingredientes funcionales e incluidos en los reestructurados cárnicos. Así los resultados obtenidos señalan que el extracto acuoso de Espagueti de Mar, podría ser utilizado como antihiper glucémico al inhibir significativamente la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa. Por otra parte, el extracto etanólico de Espagueti de Mar y el extracto acuoso de Wakame demostraron un mayor efecto inhibitorio sobre la difusión de la glucosa por lo que también tiene efectos potencialmente terapéuticos. También debemos recalcar que muchos de los efectos de las algas observados en esta tesis son independientes y que no debemos generalizar ni suponer efectos aditivos. No cabe duda de que la inclusión de



tales extractos en cárnicos u otras matrices abre nuevas líneas y estudios de investigación en el campo de la diabetes, obesidad y síndrome metabólico.

## 6.9. INTEGRATED DISCUSSION

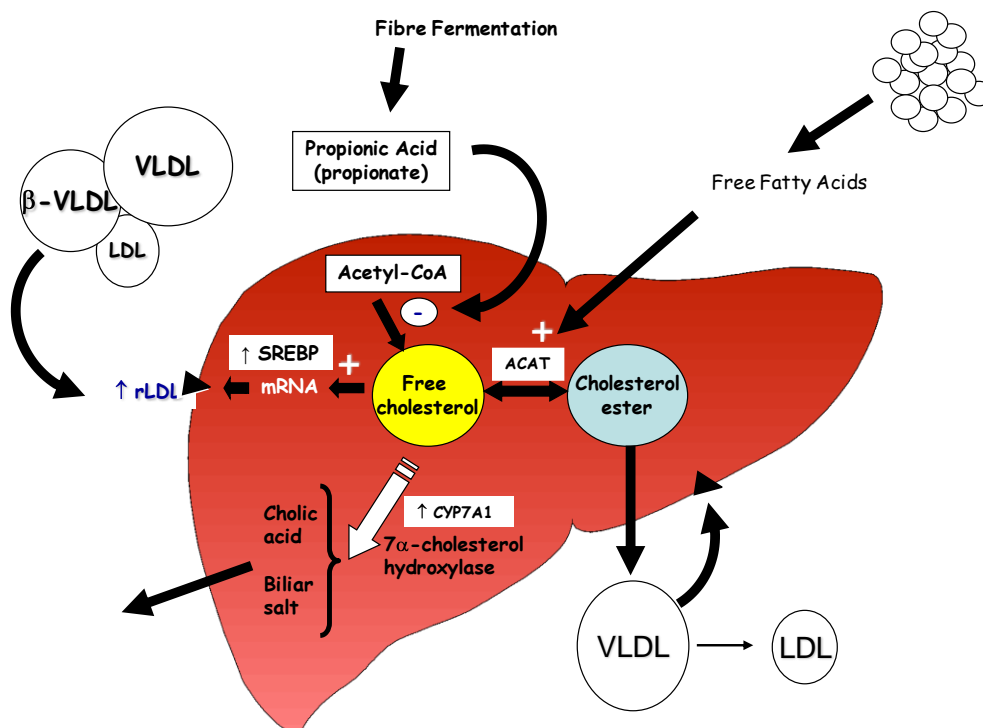
In sections 6.1 to 6.7 the different aspects with the aim of meeting the set out objectives were exposed in detail.

In this section we try to integrate the effects individually discussed previously, considering the possible effects of the ingestion of RC which contained algae on a) growth; b) structure of different organs, the liver in particular; c) CYP7A1 enzyme expression as index of cholesterol to cholic acid transformation; d) hepatic cholesterol levels; e) glutathione system levels and gene expression and activities of antioxidant enzymes, f) lipoprotein level and profile, and arylesterase antioxidant enzyme activity.

These aspects will be discussed again with the addition of cholesterol and cholic acid to the diet observing the hepatic levels, the possible effects antiapoptotic in a short-term study with RC diets containing algae and the effects on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression that could explain the effects of body weight and theory pools of cholesterol modulation.

With the aim of getting close to the molecular mechanisms of RC which contain algae, some aspects of the algae compositions and their effects on some major aspects of carbohydrates digestion were also studied.

Restructured pork diets which contain algae, but without added cholesterol, were well accepted with growth and weight gain also well accepted. However, in general, it seems to have fewer effects on the set out objectives. Nevertheless, it tended to increase the CYP7A1 expression clearly signaling the potential effects of reducing the free hepatic cholesterol levels and maintaining the effectiveness of cholic acid synthesis and lipoprotein expression and receptors activity (Figura 38). In fact, the restructured meat which contained Sea Spaghetti, followed by Nori, increased the 7A1 isoform of cytochrome P<sub>450</sub> and contributes to maintaining high levels of HDL and low levels of VLDL and LDL. The potential antioxidant effects of restructured pork diets containing seaweeds were, in general terms, similar to those of diets without restructured meat but added with seaweeds (Bocanegra *et al.*, 2003; Bocanegra *et al.*, 2009).



**Figure 38.** The outline overview of the mechanisms regulates the synthesis and excretion of cholesterol. It shows the conversion pools between free and cholesterol ester, and the lipoprotein up-take for the receptors and cholic acid formation. ACAT, acyl cholesterol acyltransferase; CYP7A, isoform 7A cytochrome P450; LDL, low density lipoprotein; rLDL, LDL receptor; SREBP, sterol regulatory element binding protein; VLDL, very low density lipoprotein;  $\beta$ -VLDL, low density lipoprotein enriched in cholesterol. Source: Sánchez-Muniz, modify from Nus and Sánchez-Muniz (2008) and Sánchez-Muniz (2012).

However, meat iron must affect the peroxidation level and the CYP7A1 expression since iron increased the lipid peroxidation levels but decreased the CYP7A1 expression (Kamei *et al.*, 2010). It shows that when the data of this PhD Thesis is compared with that of Bocanegra (2009) for glutation system and antioxidant enzymes, the consumption of RC containing algae and isolate algae follow a parallel course. Since cytochrome CYP7A1 produces free radicals, the antioxidant additive effects are due to algae properties, high iron, cooper and others mineral content (antioxidants and prooxidants) of the meat, algae and the action of CYP7A1. In this puzzle, the meat containing Wakame shows itself to have major antioxidant effects, avoiding the decrease of AE activity although their effect on biliar formation (CYP7A1) is a lot smaller (Figure 21).

The elimination of the possible “negative” compounds seems to have been done with the increase of the CYP4A1 enzyme cytochrome P450. At the structural level, the consumption of meat with algae during 5 weeks doesn’t negatively affect the form, size and structure of hepatic cells, which means that it's safe to use these kinds of diets.

Everything changes when cholesterol and cholic acid are added to the diets. The bioavailability of the diets change, since the animals present less weight gain and less dietary efficiency (Figure 18).

The worst effect on body weight was in the animals that have consumed meat with Nori and cholesterol. As a result cholesterol consumption develops an increase in hepatic cholesterol (Schultz Moreira *et al.*, 2011). It explains the increase of hepatomegaly and CYP7A1 expression on RC with Nori and Sea Spaghetti. These double mechanisms promote the decrease of the free cholesterol *pool* or regulator *pool*, therefore, inducing the increase of hepatic receptor expression that bind and “capture” the atherogenic lipoprotein (Figure 38). Indeed, the atherogenic lipoprotein levels and lipoprotein profile were decreased or normal in rats that received RC diet with algae and cholesterol compared with their controls. Nevertheless, the HDL cholesterol decreases due to a high capitation of HDL by scavenger hepatic receptors B<sub>1</sub> and contributes to the increase of the plasma cholesterol elimination by bile.

However this metabolic control assumed free radical production that contributes to the decrease of the antioxidant activity of the algae. So, the higher the CYP7A1 activation, the higher the hypocholesterolemic effect but it increases the free radical production and decreases the antioxidant effect.

As previously described, comparing the results of this Ph D memory with that of Dr. Arancha Bocanegra, the diet with Nori was not able to revert fatty degeneration on hepatocytes. However, the study of Bocanegra lasted two weeks less than the present one. Leukocytes infiltrating, fatty degeneration, cholestasis and others alterations on the rat livers were observed. We don't have an explanation that explains these results, but it may be due to iron and other substances that together with the reduction of the cholesterolaemic which must induce liver cholesterol peroxidation and oxyterols liver damage (Ye *et al.*, 2013) as shown in the histological study (Figure 27).

This hypothesis about the relation between cholesterolaemia and hepatic lesion seems to have been confirmed in the short-term study. Therefore, whereas the cholesterol levels maintain low levels (less of 100mg/dl), the consumption of RC containing algae (especially Nori or Sea Spaghetti) overturn the proapoptotic effects of the cholesterol (Figures 31-33). In the 5-week study, even with the algae effects, the increase of cholesterol levels and that of CYP7A1 blocks the protection effects of the RC enriched in algae. Accordingly, there are plasma cholesterol levels upto the consumption of RC with Nori or Sea Spaghetti would be effective and protective.

Also, with the aim of verification of the data on the relation between weight gain, adipose tissue and the effects on cholesterolaemia a study with RC with Sea Spaghetti was done, which had the best results on CYP7A1 expression, plasma cholesterol and lipoprotein profile and fewer negative effects on antioxidant status. These animals showed less weight gain compared with the animals which received a diet without cholesterol or diets with controls with cholesterol (Figure 18). The reduction of body fat would be modulated by a hypothetical equilibrium between the tendencies to increase LPL expression in order to increase the fatty synthesis, and decrease the HSL expression and avoid the excessive weight loss and fat. To this end the adipose tissue set free fatty acids which would arrive to the liver and increase the free cholesterol esterification and the receptor for the protein expression of  $\beta$ -VLDL, VLDL and LDL which explains the marked effects on lipoprotein profile (less amount of atherogenic lipoproteins) (Figure 38).

In another section, the last paper presented in this Thesis proposes the possible utilities of the some algae extracts as functional ingredients and included in RC. Therefore, the results obtained showed that the Sea Spaghetti aqueous extracts could be used as an antihyperglycaemic while significantly inhibiting the effects on  $\alpha$ -glucosidase activity. On the other hand, Ethanol-Sea Spaghetti and water-Wakame extracts exerted the highest inhibitory effects on glucose diffusion and also have potential therapeutic effects. We also notice that many effects of algae observed in this Thesis are independent and we must not generalize and assume there are additive effects. There is no doubt that the inclusion of algae extracts in meat or others matrix develop new lines of studies and research on diabetes, obesity and metabolic syndrome.

## 7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta memoria de Tesis Doctoral se ha procedido a estudiar la viabilidad de la utilización de derivados cárnicos potencialmente funcionales conteniendo tres tipos distintos de algas Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*), Espagueti de Mar (*Himanthalia elongata*) en animales en crecimiento, y sus efectos sobre diferentes aspectos del metabolismo lipoproteico y del estrés oxidativo.

Se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro* se obtuvieron extractos de las tres algas y se analizó la dinámica de los efectos de tales extractos sobre la actividad del enzima  $\alpha$ -glucosidasa y sobre la difusión de glucosa a través de membrana. Los estudios *in vivo* fueron de diferente duración: a corto plazo (una semana) y a largo plazo (5 semanas). Para ellos se emplearon ratas Wistar macho en crecimiento que se mantuvieron siguiendo los criterios éticos para la protección de animales empleados en investigación científica. Tras una semana de adaptación a las nuevas condiciones de habitabilidad (jaulas metabólicas individuales, temperatura, ciclos luz-oscuridad, humedad) recibieron las dietas experimentales. El lote Control (lote C) recibió una dieta constituida por 85 % de la dieta AIN-93M modificada y 15% de un cárnico reestructurado Control al cual se le añadió 5% de celulosa. El lote Wakame (lote W) ingirió una dieta constituida por 85 % de la dieta 93M modificada y 15% de un cárnico reestructurado en el que se había incluido el alga Wakame al 5 %. El lote Nori (lote N) consumió una dieta constituida por 85 % de la dieta AIN-93M modificada y 15% de un cárnico reestructurado en el que se había incluido el alga Nori al 5 %. El lote Espagueti de Mar (lote E) consumió una dieta constituida por 85 % de la dieta AIN-93M modificada y 15% de un cárnico reestructurado en el que se había incluido el alga Espagueti de Mar al 5 %.

También se diseñaron dietas elevadoras de la colesterolemia que contenían 85% de dieta AIN-93M modificada y agente hipercolesterolemizante (colesterol al 2% más ácido cólico al 0,4%) y 15% de los diferentes cárnicos reestructurados. Así, se obtuvo la dieta hipercolesterolemizante Control que contenía el cárnico reestructurado control (ColC), la dieta hipercolesterolemizante Wakame que contenía el cárnico reestructurado con Wakame (ColW), la dieta hipercolesterolemizante Nori que contenía el cárnico reestructurado con Nori (ColN) y la dieta hipercolesterolemizante Espagueti de Mar que contenía el cárnico reestructurado con Espagueti de Mar (ColE).

Con el fin de conocer los aspectos positivos y negativos de la utilización de los reestructurados cárnicos con algas se estudió los efectos del consumo de las dietas

experimentales sobre: a) La evolución de la ingesta dietética; b) La ganancia de peso y el índice de eficacia alimentaria; c) El tamaño y estructura del hígado d) El sistema del glutathion y las enzimas antioxidantes hepáticas; e) La expresión génica de enzimas antioxidantes hepáticas y de la CYP4A1 y CYP7A1; f) Los niveles de las enzimas LPL, HSL, ACC, y FAS del tejido adiposo; g) La lipemia, lipoproteinemia y actividad de la AE; h) El ciclo celular, actividad de la caspasa 3 y citocromo c en cultivos primarios de células hepáticas; i) La difusión de la glucosa y actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.

**Los resultados obtenidos permiten emitir las siguientes conclusiones:**

1. La combinación carne de cerdo con las algas genera un alimento de gran valor nutricional que puede ayudar a favorecer los componentes esenciales para una nutrición equilibrada.
2. Las dietas conteniendo los cárnicos reestructurados con algas y con colesterol son aceptadas de forma adecuada por las ratas Wistar macho, originando tasas de crecimiento aceptables.
3. El consumo de dietas con reestructurados cárnicos con algas, pero sin colesterol, afectó de forma muy modesta y no significativa a la lipemia, lipoproteinemia y composición de las lipoproteínas. La inclusión del agente hipercolesterolemizante en las dietas indujo profundos cambios en la composición de las lipoproteínas. Los cárnicos reestructurados con Nori y Espagueti de Mar promueven los mayores efectos hipocolesterolemizantes, reduciendo los niveles de  $\beta$ -VLDL y de LDL+IDL. No obstante, la composición de las lipoproteínas plasmáticas en las ratas que consumen estas dietas permanece similar, sugiriendo un descenso en el número de partículas de estas fracciones lipoproteicas.
4. La carne reestructurada de cerdo conteniendo el alga Wakame con y sin colesterol añadido ofrece buenos efectos antioxidantes comparados con los cárnicos reestructurados con el alga Nori y Espagueti de Mar. El cárnico con Wakame incrementa la actividad de la enzima glutathion reductasa, glutathion total y concentraciones de GSH, y disminuye el índice redox. No obstante, la expresión génica ligada a los enzimas antioxidantes no sigue la misma tendencia, aunque en términos generales el cárnico con alga Wakame es el que más la incrementa.

5. La estructura hepática no se alteró en términos generales con la ingesta de las dietas conteniendo los cárnicos reestructurados con algas sin colesterol añadido; sin embargo, en las dietas hipercolesterolémiantes, preferentemente en el caso de las dietas con Nori o Espagueti de Mar, sí se observó daño hepatocelular con elevada infiltración grasa, leucocitaria y colestasis.
6. La ingestión del reestructurado cárnico con Espagueti de Mar reduce la expresión génica del enzima HSL, particularmente en los animales hipercolesterolémicos, contribuyendo a reducir las pérdidas de peso observadas en los animales controles que ingieren dietas enriquecidas en colesterol.
7. A corto plazo, el consumo de carne reestructurada de cerdo conteniendo Nori o Espagueti de Mar, reduce los efectos proapoptóticos hepáticos inducidos por el colesterol en la dieta.
8. El extracto acuoso de Espagueti de Mar reduce significativamente *in vitro* la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa.
9. El extracto etanólico de Espagueti de Mar y el extracto acuoso de Wakame mostraron un mayor efecto inhibidor de la difusión de la glucosa.

### **Conclusión general**

La inclusión en la dieta de un 15% de cárnicos reestructurados conteniendo algas parece segura. Sin embargo, su inclusión en el marco de dietas enriquecidas en colesterol requiere ulteriores estudios, teniendo en cuenta algunos de los aspectos negativos discutidos en esta memoria de tesis doctoral. Si bien los efectos hipocolesterolémiantes de los reestructurados cárnicos con Nori o con Espagueti de Mar son relevantes, la relación inversa entre los efectos hipocolesterolémiantes y el estrés oxidativo y daño hepático encontrados demandan cierta cautela a la hora de impulsar el consumo de estos productos cárnicos potencialmente funcionales.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral señalan que muchos de los efectos observados para los diferentes reestructurados cárnicos o extractos de algas son independientes y no superponibles, por lo que cualquier generalización sobre la utilidad de las algas debe ser evitada.



## 8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The aim of the present research was to study the viability of the utilization of meat products which are potentially functional and contain three kinds of different algae Wakame (*Undaria pinnatifida*), Nori (*Porphyra umbilicalis*), Sea Spaghetti (*Himanthalia elongata*) on growing animals, and their effects on different aspects of lipoprotein metabolism, oxidative stress and liver structure.

Studies *in vitro* and *in vivo* were done. In the *in vitro* studies extracts of the three algae were obtained and the dynamic of the algae extracts effects on  $\alpha$ -glucosidase activity and glucose diffusion through the membrane were analyzed. In the *in vivo* studies, short term (1-week) and a long term (5-weeks) studies were performed. Growing male rats which were kept in compliance with ethical criteria for the protection of scientific research animals were used for the studies. After a one week adaptation to environmental conditions (individually in metabolic cells, temperature, light-dark cycle, humid), the animals received the experimental diets. The control diet (C) contained 85% rodent feed (AIN-93M modified) and 15% restructured meat control to which 5% cellulose had been added. The Wakame diet (W) consisted of a mixture of AIN 93 M feed (85%) and restructured Wakame meat (15%). The Nori diet (N) consisted of a mixture of AIN-93 M feed (85%) and restructured Nori meat (15%). The Sea Spaghetti diet (N) consisted of a mixture of AIN-93 M feed (85%) and restructured Sea Spaghetti meat (15%).

Also, cholesterol rising diets which containing 85% of AIN-93M modified diet and hypercholesterolemiant agent (2% cholesterol and 0, 4% cholic acid) and 15% of the different RC were designed. Therefore, restructured meat control (ColC), the hypercholesterolemic Wakame diet containing restructured meat with Wakame (ColW), the hypercholesterolemic Nori diet containing restructured meat with Nori (ColN), the hypercholesterolemic Sea Spaghetti diet containing restructured meat with Sea Spaghetti (ColE) were obtained.

With the aim of knowing the positive and negative aspects of the utilization of the restructured meat with algae, the effects of the consumption of experimental diets on: a) dietetic ingestion evolution; b) weight gain and dietary efficiency ratio; c) size and liver structure; d) glutation system and hepatic antioxidant enzymes; e) hepatic antioxidant enzymes and CYP4A1 and CYP7A1 gene expression; f) LPL, HSL, ACC, and FAS levels on adipose tissue; g) lipidaemia, lipoproteinaemia and AE activity; h)

cell cycle, caspase 3 activity and cytochrome c levels on primary culture of hepatocytes; i) glucose diffusion and  $\alpha$ -glucosidase activity *in vitro* were studied.

**The obtained results allow the following conclusions:**

The obtained results allow us to conclude:

1. The combination of meat pork with the algae generates a food with great nutritional value and may help to stimulate the essential compounds for balanced nutrition.
2. The diets with restructured meat with algae and cholesterol are well accepted for male Wistar rats, with acceptable growth rates.
3. The consumption of the diets with restructured meat with algae but without cholesterol slightly but not significantly affects the lipidaemia, lipoproteinaemia and lipoprotein composition. The inclusion of a hypercholesterolemic agent in the diets induced profound changes on lipoprotein composition. The restructured meat with Nori and Sea Spaghetti partially block the rising effect of dietary cholesterol; they decreased  $\beta$ -VLDL and LDL+IDL levels. Nevertheless, the composition of those plasma lipoproteinsw in rats that consumed these diets remains similar, suggesting a decrease in the number of these lipoprotein particles.
4. The restructured meat containing Wakame with or without cholesterol added offers great antioxidant effects compared with restructured meat with Nori and Sea Spaghetti. The restructured meat with Wakame increases the glutathion reductase enzyme activity, total glutathion and GSH concentrations, and decreases the redox index. However, changes in the gene expression and activity of antioxidant enzymes do not have the same tendency even though in general terms the pork with Wakame induced the highest increases in gene expression.
5. The hepatic structure did not change in general terms with the ingestion of the diets containing restructured meat with algae without added cholesterol; however, in hypercholesterolemic diets, mainly in the case of Nori and Sea Spaghetti, hepatocellular damage with high fatty, leukocytes and cholestasis infiltrations were observed.
6. The ingestion of the restructured meat with Sea Spaghetti decreases the HSL enzyme gene expression, mainly in hypercholesterolemic animals; it contributes to the reduction of weight loss observed in control animals that ingest diets enriched with cholesterol.

7. In the short term, the consumption of restructured pork meat containing Nori or Sea Spaghetti decreases the liver proapoptotic effects induced by the cholesterol in the diet.
8. Sea Spaghetti aqueous extracts significantly reduce  $\alpha$ -glucosidase activity *in vitro*.
9. Ethanol-Sea Spaghetti and water-Wakame extracts exerted the highest inhibitory effects on glucose diffusion.

### **General conclusions**

The inclusion of 15% restructured pork which contains algae seems to be safe. However, its inclusion in the framework with cholesterol-enriched diets requires further studies, taking into account some negative aspects discussed in this Doctoral Thesis report. Even though the hypocholesterolemic effects of the restructures meat with Nori or Sea Spaghetti are relevant, the reverse relationship between the hypocholesterolemic effects and oxidative stress and hepatic damage demand some caution for the consumption of these potential functional meats.

The results obtained in this Doctoral Thesis report show that the many effects induced by the different restructured pork or algae extracts are independent and non necesarely concatenated. Therefore, any generation about the utilities of the algae must be avoided.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

A. Marti, M.<sup>a</sup> J. Moreno-Aliaga, M.<sup>a</sup> A. Zulet y J. A. Martínez. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr. Hosp.* (2005) XX (3) 157-164. Revisión.

Adnot S (1998), "Tobacco: an atherogenic, thrombogenic or spasmogenic factor?", *Arch Mal Coeur Vaiss*, 5, 33-38.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.

Aguilera J, Dummermuth A, Karsten U, Schriek R, Wiencke C (2002), "Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae". *Polar Biol*, 25, 432-441.

Albarracin C, Fuqua B, Geohas J, Juturu V, Finch MR and Komorowski JR. Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J Cardiometaab Syndr.* 2007;2:91-97.

Albert C M, Cook N R, Gaziano J M, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring J E, Manson J E (2008), "Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial", *JAMA*, 299, 2027-2036.

Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011a. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 331–336.

Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011b. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Mar. Drugs* 9, 2605-2621.

Alpers DH, Lock DR, Lancaster N, Poksay K y Schonfeld G. Distribution of apolipoproteins A-I and B among intestinal lipoproteins. *J Lip Res.* 1985;26:1-10.

Amano H, Kakinuma M, Coury D, Ohno H and Hara T. Effect of a seaweed mixture on serum lipid level and platelet aggregation in rats. *Fish Sci.* 2005;71:1160-1166.

American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Cholesterol in Childhood, *Pediatric.* 1998;101:141-147.

American Heart Association. Cardiovascular disease statistics. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml> (access 2012).

Anderson RG, Goldstein JL y Brown MS. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73:2434-2438.

Anthony CP. (ed.). (1970). Anatomía y fisiología. Interamericana, Mexico, pp. 372-375.

Aranda A y Herrera E. Liver lipogenesis in vivo in fed and food deprived suckling rats. *Rev Esp Fisiol.* 1974;30(1): 31-6.

Arasaki S y Teruko Arasaki T. Low calorie, high nutrition vegetables from the sea to help you look and feel better. *Japan Pubns.* 1981;ISBN-10: 087040475X.

Ardiansyah A, Shirakawa H, Koseki T, Ohinata K, Hashizume K y Komai M. Rice bran fractions improve blood pressure, lipid profile, and glucose metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* 2006;54:1914-1920. Erratum in: *J Agric Food Chem.* 2006;4:9277.

Arihara, K.: Functional Foods. En W. Jensen, C. Devine & M. Dikemann (Eds.), *Encyclopaedia of Meat Sciences* (London, UK: Elsevier Science Ltd, 2004; Vol.1,pp.492-499.

Ascaso JF, y cols. Diabetes mellitus y riesgo cardiovascular. Recomendaciones del grupo de trabajo diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular de la Sociedad, 2009; Española de Diabetes.

Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ y Schaefer EJ. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting

recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2013-2015.

Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, McNamara JR, Horvath KV y Schaefer EJ. Distribution of apo A-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2670-2676.

Athukorala Y, Lee K W, Kim S K and Jeon Y J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresour Technol.* 2007;98: 1711-1716.

Badimón L, Hernández Vera R and Vilahur G. Fat tissue, thrombosis y atherosclerosis. En Obesity. Serrano Ríos M, Ordovás J M and Gutiérrez Fuentes J A (eds.). Elsevier and Fundacion Lilly, Amsterdam, 2010;pp. 233-244.

Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. (eds.) (1979). The Laboratory Rat. Academic press, pp. 83.

Bantle J P. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J Nutr.* 2009; 139:1263S-1268S.

Barry H y Gutteridge JMC. In Free Radicals in Biology and Medicine, Barry H. (ed), Oxford, Clarendon Press, 1989; pp, 254–255.

Barter PJ y Lally JL. The activity of an esterified cholesterol transferring factor in human and rat serum. *Biochim Biophys Acta.* 1978;531:233-236.

Bastida S, Vaquero MP, Veldhuizen M y Sánchez-Muniz FJ. Selected trace elements and minerals in cord blood: association with lipids and lipoproteins at birth. *Acta Paediatr.* 2000;89:1201-1206.

Bastida S, Viejo JM y Sánchez-Muniz FJ. Olive oil-fried sardine consumption increase fat, cholesterol and bile acids excretions and accelerates the normalization of the lipoprotein profile and peroxidation in hypercholesterolaemic rats. *Ital J Food Sci.* 2007;19:15-24.

Bastida S.: Dieta equilibrada. ¿Viejos conceptos, nuevas ideas? En: Derivados cárnicos funcionales: Estrategias y perspectivas. Fundación Española de Nutrición. Madrid, 2005; pp.9-20.

Bastida S, García-Linares MC, Viejo J, García-Arias MT, y Sánchez-Muniz FJ. Effect of olive oil-fried sardine consumption on the cholesterol content of serum, lipoprotein, spleen and adipose tissue of hypercholesterolemic rats. *Ann Nutr Metabol.* 2006;50:54-58.

Beck EJ, Tapsell LC, Batterham MJ, Tosh SM y Huang XF: Oat beta-glucan supplementation does not enhance the effectiveness of an energy-restricted diet in overweight women. *Br J Nutr.* 2010; 103: 1212–1222.

Belmonte S.: Importancia de la nutrición y hábitos de vida en la prevención. Estrategias de educación nutricional en la Comunidad de Madrid. En: Genética, nutrición y enfermedad. Vaquero P (Coordinadora general). Instituto Tomas Pascual Sanz y Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Editado por EDISMA. Editores Médicos, S.A., 2008; pp.33-49.

Besterman EM. Effects of laminarin sulphate on experimental atherosclerosis and on serum lipids in rabbits during long-term intermittent cholesterol feeding. *Atherosclerosis.* 1970;12:85-96.

Bhakuni DS y Rawat DS. (2005). Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria. In: Bioactive marine natural products, Co-published by Anamaya Publishers and Springer, New Delhi, pp. 1-25.

Bijur GN, De Sarno P, Joje RS. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem.* 2000;275:7583–7590.

Bilheimer DW, Eisemberg S y Levy RL. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta.* 1972;260:212-221.

Blé-Castillo JL, Rodríguez-Hernández A, Miranda-Zamora R, Juárez-Oropeza MA y Díaz-Zagoya JC. *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the



administration of simvastatin, ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sci.* 2002;70, 2665-2673.

Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, Benedí J y Sánchez-Muniz FJ. A Nori, but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolemic growing Wistar rats. *Br J Nutr.* 2008; 99:272-280.

Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Nus M, Sánchez-Montero JM y Sánchez-Muniz FJ. Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br J Nutr.* 2009a;102:1728-1739.

Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S and Sánchez-Muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food.* 2009b; 12:236-258.

Bocanegra A, Benedí J and Sánchez-Muniz FJ. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr.* 2006;95:696-702.

Bocanegra A, Benedí J y Sanchez-Muniz FJ. Differential effects of Konbu and Nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr.* 2006; 95:696-702.

Bocanegra A, Nieto A, Blas B y Sánchez-Muniz FJ. Diets containing a high percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1473-1480.

Bocanegra A, Nieto A, Blas B y Sánchez-Muniz FJ. Diets containing a high percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41:1473–1480.

Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E y Rasmussen K; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine

lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 354:1578–1588.

Bonanome A y Grudy SM. Effect of stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med*. 1985;318:1244-1249.

Boscha X, Alfonso F, Bermejo J. Diabetes y enfermedad cardiovascular. Una mirada hacia la nueva epidemia del siglo XXI. 2002.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248–254.

Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A y Poapst M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med*. 1978;298:1265-1273.

Broekmans WM, Klöpping-Ketelaars IA, Schuurman CR, Verhagen H, van den Berg H, Kok FJ y van Poppel G. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J Nutr*. 2000;130:1578-1583.

Brousseau ME, Stucchi AF, Vespa DB, Schaefer EJ y Nicolosi RJ. A diet enriched in monounsaturated fats decreases low density lipoprotein concentrations by a different mechanism than does a diet enriched in polyunsaturated fats in Cynomolgus monkeys. *J Nutr*. 1993;123:2049-2058.

Brown MS y Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am*. 1984;251:58-66.

Brown MS, Goldstein JL y Fredrickson DS. Familial type 3 hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia). En: The metabolic basis of inherited disease. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL y Brown MS. Eds. McGraw-Hill, 1983;New York, Capítulo 32.

Brunner EJ, Rees K, Ward K, Burke M y Thorogood M. Dietary advice for reducing cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;4:CD002128.

Burtin P. Nutritional value of seaweeds. *Electron J Environ Agric Food Chem*. 2003;2: 498-503.

Canales A y Sánchez-Muniz FJ. Paraoxonase, something more than an enzyme? *Med Clin (Barc)*. 2003;121:537-548.

Canales A, Benedí J, Nus M, Librelotto J, Sánchez-Montero JM, y Sánchez-Muniz, FJ. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26:225-232.

Canales A, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Corella D, Guillen M y Benedí J. Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *Eur J Clin Nutr*. 2011; 65:703-711.

Carlson LA y Ballantyne D. Changing relative proportions of apolipoproteins CII and CIII of very low density lipoproteins in hypertriglyceridaemia. *Atherosclerosis*. 1976;23:563-568.

Carrella M y Cooper AD. High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:338-342.

Carru C, Pasciu V, Sotgia S, Zinellu A, Nicoli M C, Deiana L, Tadolini B, Sanna B, Masala B y Pintus G. The oxidative state of LDL is the major determinant of anti/prooxidant effect of coffee on Cu catalysed peroxidation. *Open Biochem J*. 2011; 5:1-8.

Cascales M. La toxicidad del oxígeno. Estrés oxidativo. En: Estrés oxidativo. envejecimiento y enfermedad. Instituto de España, Madrid, 1999; pp 9-46.

Cascio G, Schiera G y Di Liegro I. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev*. 2012;8:2-17.

Cava F. Inducción de Hipercolesterolemia en ratas. Su prevención mediante consumo de sardinas fritas en aceite de oliva. Tesina, Madrid, 1986.

Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SK y Jeon YJ. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ECA) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006;35:307-314.

Chajek T y Eisenberg S. Very low density lipoprotein. Metabolism of phospholipids, cholesterol, and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart. *J Clin Invest.* 1978;61:1654-1665.

Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Siquin C, Fisher A M and Boisson-Vidal C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity”, *Carbohydr Res.* 1999;319, 154-165.

Chisolm GM and Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Bio Med.* 2000;28:1815–1826.

Chomeczynski P, y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 1987;162:156–159.

Cofrades S, López-López I, Bravo L, Ruiz-Capillas C, Bastida S, Larrea MT et al Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int.* 2010;15: 361-370.

Cofrades S, López-López I, Bravo L, Ruiz-Capillas C, Bastida S, Larrea MT y Jiménez-Colmenero F. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int.* 2010;5:361–370.

Cofrades S, López-López I, Solas MT, Bravo L y Jiménez-Colmenero F. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science.* 2008;79:767–776.

Colombo ML, Risè P, Giavarini F, DE Angelis L, Galli C and Bolis CL. Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Plant Foods Hum Nutr.* 2006;6:67-72.

Commission Decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of oil rich in DHA (docosahexaenoic acid) from the microalgae *Schizochytrium* sp. as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (notified under document number C (2003) 1790).

Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D and Astiasarán I. Componentes funcionales en aceite de pescado y de alga. *Nutr Hosp*. 2006;21:369-373.

Connor WE, Lin DS, Colvis C. Differential mobilization of fatty acids from adipose tissue. *J Lipid Res*. 1996;37:290–298.

Corella D y Ordovas JM. Nutrigenomics in cardiovascular medicine. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:637–651.

Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kieseletter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäuml H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J y Marrugat J; EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145:333-341.

Cuesta C, Sánchez-Muniz FJ, Ródenas S, Rodríguez-Gil S y Merinero MC. Lipoprotein profile and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52:675-683.

Cueva Tello JP (2007). Estudio de la actividad inhibidora del extracto semipurificado de larvas de gusano de seda (*Bombyx Mori*) producida sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y su efecto en la concentración de la glucosa sanguínea en ratones BALB/C. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.

Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D’Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozovich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson GJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S y Nifantiev NE. On behalf of the Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia (CINBO): A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology*. 2007;17:541-552.

Czerwinski AW y Ginn HE. Bismuth nephrotoxicity. *Am J Med*. 1964;37:969-957.

Dandona P, Chaudhuri A y Dhindsa S. Proinflammatory and prothrombotic effects of hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2010;33:1686-1687.

Daniel H. Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research. *Br J Nutr.* 2002;87 (Supl.2):S305-11. Review.

Daumerie CM, Woollett LA y Dietschy JM. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:10797–10801.

Dembitsky VM, Pechenkina-Shubina E y Rozantsvet OA. Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. *Phytochem.* 1991;30:2279-2283.

Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr.* 1998; 128:444S-448S.

Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology.* 1993;4:912-918.

Diez-Fernandez, C., Sanz, N., Cascales, M., 1996. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem. Pharmacol.* 51, 1159–1163.

Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB y Roberfroid MB. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *British Journal of Nutrition.* 1999; 81:(4), S1-S27.

Dolphin PJ. Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats. *J Lipid Res.* 1981;22:971-989.

Dreher ML (ed.), (1987). Handbook of dietary fibre, an applied approach. Marcel Dekker, New York, pp. 1-468.

Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT y Krauss RM. A very low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:411-8.

Dumelod BD, Ramirez RPB, Tiangson CLP, Barrios EB y Panlasigui LN. Carbohydrate availability of arroz caldoso with lambda-carrageenan. *Int J Food Sci Nutr.* 1999;50:283-289.

Durrington PN, Mackness B y Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:473-480.

Ecija JL and Vazquez M. Hipertensión arterial. in: Muñoz MT, Hidalgo MI, Rubio LA, and Clemente J (eds), *Pediatría extrahospitalaria, Aspectos básicos en Atención Primaria*, 3ª edición, Madrid, Ed. Ergón, 2001; pp. 261-267.

Eckerson HW, Romson J, Wyte C y La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Human Genet.* 1983;35:214-27.

Edwards CA, Blackburn NA, Cragne L, Davison P, Tomlin J, Sugden K et al. Viscosity of food gums determined in vitro related to their hypoglycaemic actions. *Am J Clin Nutr* 1987;46:72-77.

Encuesta Española de Ingesta Dietética (2011), [http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/Presentacion\\_ENIDE.pdf](http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentacion_ENIDE.pdf).

Esteller Pérez A, Cabré Gelada E y Peña Quintana L. (2003). Nutrición en las enfermedades hepato biliares. En. Tratado de nutrición. Tomo IV. Nutrición clínica. Plana M, Álvarez J, Culebras JM, García de Lorenzo A, Maldonado J, Mesejo A, Montejo, Sánchez-Muniz y cols. *J Nutr.*

FAO/WHO (2010). The Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. FAO food and nutrition paper 91. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. ISSN 0254-4725.

Ferguson LR. Nutrigenomics approaches to functional foods. *J Am Diet Assoc.* 2009; 109: 452–458.

Fidge N y Poulis P. Studies on the metabolism of rat serum very low density apolipoprotein. *J Lipid Res.* 1975;16:367-378.

Fielding CJ y Havel RJ. Lipoprotein lipase: properties of the enzyme in solution. *Arch Pathol Lab Med.* 1977;101:225-229.

Fielding CJ. Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *FASEB J.* 1992; 6:3162–3168.

Flohé L y Ursini F. Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1485-1490.

Folch J, Lees M y Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226: 497–509.

Food and Agricultura Organization: El estado mundial de la pesca y la agricultura. Departamento de la esca de la FAO (Roma). Organización de las Naciones Unidas para la Pesca y la Alimentación, 2006.

Frühbeck G. The adipose tissue: from a passive fat depot to an active endocrine organ. En: Obesity. Serrano-Rios M, Ordovás JM, Gutiérrez Fuentes JA. Elsevier, Amsterdam, 2011, pp.87-106.

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5600s/y5600s00.pdf> (2004) (acceso Mayo 2008).

Fundación Faustino Orbegozo Eizaguirre. Curvas y tablas de crecimiento (Estudio longitudinal y transversal). Instituto de Investigación sobre crecimiento y desarrollo. Bilbao. <http://www.aepap.org/crecorbegozo.htm>

Gallagher AM, Flatt PR, Duffy G y Abdel-Wahab Y. The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutr Res*. 2003; 23:413-424.

García Gómez LJ y Sánchez-Muniz FJ. Review: cardiovascular effects of garlic (*Allium sativum*). *Arch Latinoamer Nutr*. 2000; 50:219-229.

Ghaffari T, Nouri M, Irannejad E y Rashidi M. Effect of Vitamin E and selenium supplement on Paraoxonase-1 activity, oxidized low density lipoprotein and antioxidant defense in diabetic rats. *BioImpacts*. 2011;1:121-128.

Ghosh T, Chattopandhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P y Ray B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*. 2009;19:2-15.

Gómez A. Metabolismo de las lipoproteínas. En: Lipoproteínas plasmáticas. Boehringer Mannheim, S.A., Barcelona, 1988; pp. 47-58.



Gómez Ordoñez E. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios in vitro e in vivo. Tesis Doctoral, UCM, Madrid, 2012.

Gómez-Juaristi M, González-Torres L, Bravo L, Vaquero MP, Bastida S y Sánchez-Muniz FJ. Beneficial effects of chocolate on cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2011;26:289-292.

Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A y Rupérez P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res Int.* 2010;43:2289–2294.

González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ, Ródenas S, Sevillano MI, Larrea Marín MT y Bastida S. Differences in metal and metalloid content in the hair of normo- and hypertensive postmenopausal women. *Hypertens Res.* 2010;33:219-224.

Gray AM, Flatt PR. Actions of the traditional anti-diabetic plant, Agrimony eupatoria (agrimony): effects on hyperglycaemia, cellular glucose metabolism and insulin secretion. *Br J Nutr.* 1998;80:109-114.

Gray AM, Flatt, PR. Nature's own pharmacy: the diabetes perspective. *Proc Nutr Soc.* 1997;56 (1B):507-517.

Green PH y Riley JW. Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation. *Aust N Z J Med.* 1981;11:84-90.

Green PHR, Glickman RM, Saudek CD, Blum CB y Tall AP. Human intestinal lipoprotein studies in chyluric subjects. *J Clin Invest.* 1979;64:233-242.

Griffith O. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinilpyridine. *Anal Biochem.* 1980;106:207-212.

Grune T, Sommerburg O y Siems WG. Oxidative stress in anemia. *Clin Nephrol.* 2000;53:18-22.

Gudiel-Urbano M y Goñi I. Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. *Nutr Res.* 2002;22:323-331.

Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council (NRC), National Institutes of Health, Publication No. 86-23, Washington, DC, 1985.

Guillon F y Champ M. Structural and physical properties of dietary fibres and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int.* 2000;33:233-245.

Guo Luke SS, Hamilton RL, Ostwald R y Havel RJ. Secretion of nascent lipoproteins and apolipoproteins by perfused livers of normal and cholesterol-fed guinea pigs. *J Lipid Res.* 1982;23:543-555.

Ha YC, Calvert GD, McIntosh GH y Barter PJ. A physiologic role for the esterified cholesterol transfer protein: in vivo studies in rabbits and pigs. *Metabolism.* 1981;30:380-383.

Harris WS. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:1645S-1654S.

Hawkins WW and Leonard VG. Antithrombic activity of carrageenan in human blood. *Can J Physiol Biochem.* 1963;41, 1325-1327.

Hawkins WW, Leonard VG, Maxwell JE and Rastogi KS. A study of the prolonged intake of small amounts of EDTA on the utilization of low dietary levels of calcium and iron by the rat. *Can J Physiol Biochem.* 1962;40:391-395.

Hay K, Smiciklas-Wright J y Treu J. Nutrition and aging: Drug-nutrient interactions. Penn State Nutrition & Extension Partnership Project. Editorial The Pennsylvania State University, 2001; pp. 1-9.

Hebebrand J, Friedel S, Shauble N, Geller F, Hinney A: Perspective: molecular genetic research in human obesity. *Obes Rev* 2003, 4:139-146.

Hernández Figueroa TT, Rodríguez Rodríguez E y Sánchez-Muniz FJ. The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention? *Arch Latinoamer Nutr.* 2004;54:380-394.

Hissin PF y Hill RA. Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry.* 1976;74:214–226.

Hoffmane R, Paper DH, Donaldson J, Alban S y Franz G. Characterization of a laminarin sulfate which inhibits basic fibroblast growth-factor binding and endothelial-cell proliferation. *J Cell Sci.* 1995;108:3591-3598.

Holdt LS y Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 2011; 23:543-597.

[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_916\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916_spa.pdf) (acceso Mayo 2013).

[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/) (acceso junio 2012).

[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/) (acceso junio 2012).

Hu JF, Geng MY, Zhang JT and Jiang HD. An in vitro study of the structure-activity relationships of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect. *J Asian Nat Prod Res.* 2001;3:353-358.

Hui DY, Innerarity TL y Mahley RW. Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors. *J Biol Chem.* 1981;256:5646-5655.

Indergaard M y Minsaas J. Animal and human nutrition. En: Seaweed resources in Europe. Uses and potential. (Guiry M D and Blunden G, eds.) John Wiley & Sons, New York, 1991; pp. 21-64.

Ito K y Tsuchiya Y. The effect of algal polysaccharides on the depressing of plasma cholesterol level in rats, In: Proceeding of The Seventh International Seaweed Symposium. Tokyo University Press, Tokyo, 1972; pp. 451-454.

J.C. (coordinadores). Gil A. (Ed.). (2010). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, pp 721-766.

James SL, Muir JG, Curtis SL, Gibson PR. Dietary fibre: a roughage guide. *Intern Med J.* 2003;33:291-296.

Janero DR, Siuta-Mangano P, Miller KW y Lane MD. Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. *J Cell Biochem.* 1984;24:131-152.

Jenkins DJ, Kendall CW, Alexen M, Augustin LS y Vuksan V. Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2000; 11:49-56.

Jeong BY, Cho DM, Moon SK y Pyeum JH. Quality factors and functional components in the edible seaweeds. I. Distribution on n-3 fatty acids in 10 species of seaweeds by their habitats. *J Korean Soc Food Nutr*. 1993;22:612-628.

Jiménez-Colmenero F, Carballo J, y Cofrades S. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat science*. 2001;59:5-13.

Jiménez-Colmenero F, Reig M y Toldrá F. New approaches for the development of functional meat products. En: Advanced Technologies for meat processing. Marcel Dekker, Inc. (en preparación) Eds. Nollet & F. Toldrá, 2005; New York.

Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, Collaborators. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry*. 2010;123:959-967.

Jiménez-Colmenero F. Reig, M, y Toldrá F.: New approaches for the development of functional meat products. En: Nollet L. M. L. Toldrá, F. (eds). Advanced Technologies for Meat Processing. Boca Raton London, New York: Taylor & Francis Group, 2006; pp.275-308.

Jiménez-Colmenero F.: Meat based functional foods. In: Hui Y. H., Associate editors, Chandan y cols.(eds), Handbook of Food Products Manufacturing. (New Jersey: John Wiley & Son, Inc, 2007a; pp.989-1015.

Jiménez-Colmenero F. Healthier lipid formulation approaches in meat based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. Trends in Food Science and Technology, 2007b; 18, 567-578.

Jiménez-Escrig A y Goñi I. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Arch Latinoam Nutr*. 1999; 49:114-120.

Jiménez-Escrig A, Rupérez P, Gómez-Ordoñez E y Tenorio MD. Antioxidant capacity and prebiotic effect of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats. *J Appl Phycol*. 2012;DOI:10.1007/s10811-012-9884-3.

Jiménez-Escrig A y Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res.* 2000;20:585-598.

Jollow DJ. Glutathione thresholds in reactive metabolite toxicity. *Arch Toxicol Suppl.* 1980;3:95-110.

Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295:849-868.

Jormalainen V y Honkanen T. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J Evol Biol.* 2004; 17: 807–820.

Jung WK, Athurkoral Y, Lee YJ, Cha SH, Lee CH, Vasanthan T, Choi KS, Yoo SH, Kim SK, y Jeon YJ. Sulfated polysaccharide purified from *Ecklonia cava* accelerates antithrombin III-mediated plasma proteinase inhibition. *J Appl Phycol.* 2007;19:425-430.

Kamiyama T, Miyakawa H, Li JP, Akiba T, Liu JH, Liu J, Marumo F y Sato C. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995;88:177-186.

Kanazawa S y Herbert V. Noncobalamin vitamin B12 analogues in human red cells, liver, and brain. *Am J Clin Nutr.* 1983;37:774-777.

Kane GC y Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clinic Proceedings.* 2000;75:933-942.

Kane JP, Hardman DA y Paulus HE. Heterogeneity of apolipoproteins B; isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:2465-2469.

Kang K, Park Y, Hwang HJ, Kim SH, Lee JG y Shin HC. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res.* 2003;26:286-293.

Kaput J y Rodríguez RL: Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics.* 2004;15:16:166-77.

Kaput J. Nutrigenomics research for personalized nutrition and medicine. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19:110–120.

Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Guigliano D, Goudevenos JA y Panagiotako DB The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components. A meta-analysis of 50 studies and 534,906 Individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:1299-1313.

Katan MB, Grudy SM y Willett WC. Should a low-fat, high carbohydrate diet be recommended for any one? Beyond low-fat diets. *N Engl J Med.* 1997;337:563-569.

Kekki M. Lipoprotein-lipase action determining plasma high density lipoprotein cholesterol level in adult normolipemics. *Atherosclerosis.* 1980;37:143-150.

Kern PA. High adipose tissue lipoprotein lipase activity plays a causal role in the aetiology of obesity; in Angel A (ed): Progress in Obesity Research. London, J Libbey, 1996, pp 25–50.

Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV y Ziganshina OA. Physical-chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae. *Russ J Mar Biol.* 2001;27:53-64.

Kim IH y Lee JH. Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from macroalgae. *J Ind Eng Chem.* 2008;14:568-572.

Kim KT. (2012) Seasonal variation of seaweed components and novel biological function of fucoidan extracted from brown algae in Quebec. PhD Thesis. Quebec, Canada, 142 pp.

Kimura Y, Watanabe K y Okuda H. Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol.* 1996;54:47-54.

Kindness G, Williamson FB y Long WF. Effect of polyanetho-lesulphonic acid and xylan sulphate on antithrombin III activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979;13:1062-1068.

Kiriyama S, Okazaki Y y Yoshida A. Hypocholesterolemic effect of polysaccharides and polysaccharide-rich foodstuffs in cholesterol-fed rats. *J Nutr.* 1969;97:382-388.

Kissebah AH, Alfarsi S y Evans DJ. Low density lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidemia. Mechanism of the multiple lipoprotein phenotypic expression. *Arteriosclerosis*. 1984;4:614-624.

Klevay LM. Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis. *Am J Clin Nutr*. 1975; 28:764-770.

Koivikko R, Eränen JK, Lojonen J y Jormalainen V. Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *J Chem Ecol*. 2008; 34: 57–64.

Koschinsky ML. Lipoprotein (a) and atherosclerosis: new perspectives on the mechanism of action of an enigmatic lipoprotein. *Curr Atheroscler Rep*. 2005;7:389-395.

Krauss RM y Dreon DM. Low-density-lipoprotein subclasses and response to a low-fat diet in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 1995, 62:478S-487S.

Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW, Kris P, Goldberg IJ, Kotchen TA, Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K, Wylie Rosset J, St Jeon S, Suttie J, Tribble DL y Bazzarre TL. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association, *Circulation*. 2000;102:2284-2299.

Krauss RM. Dietary and genetic effects of LDL heterogeneity. *World Rev Nutr Diet*. 2001; 89:12-22.

Kritchevsky D, Tepper S, Czarnecki S y Klurfeld D. Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis*. 1982;41:429-431.

Krotkiewski M, Aurell M, Holm G, Grimby G and Szczepanik J. Effects of a sodium-potassium ion-exchanging seaweed preparation in mild hypertension. *J Hypertens*. 1991;4:483-488.

Kumar RV y Sinha VR. Newer insights into the drug delivery approaches of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9:403-416.

Lahayen M y Kaeffer B. Seaweed dietary fibres: structure, physico-chemical and biological properties relevant to intestinal physiology. *Sci Aliments*. 1997;17:563-584.

Lalonde (1974). citado por Belmonte (2008).

Lamela M, Anca J, Villar R, Otero J y Calleja JM. Hypoglycemic activity of several seaweed extracts. *J Ethnopharmacol*. 1989;27:35-43.

LaRosa JC, Levy RI, Herbert P, Lux SE y Fredrickson DS. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1970;41:57-62.

Larrea-Marín MT, Pomares-Alfonso MS, Gómez-Juaristi M, Sánchez-Muniz FJ y Ródenas de la Rocha S. Validation of an ICP-OES method for macro and trace element determination in Laminaria and Porphyra seaweeds from four different countries. *J Food Comp Anal*. 2010;23:814-820.

Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churrua I, Simón E, Zechner R, Portillo MP: Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem*. 2012; 23: 379–384.

Latulippe ME, Meheust A, Augustin L, Benton D, Berčík P, Birkett A, Eldridge AL, Faintuch J, Hoffmann C, Jones JM, Kendall C, Lajolo F, Perdigon G, Prieto PA, Rastall RA, Sievenpiper JL, Slavin J y de Menezes EW. ILSI Brazil International Workshop on Functional Foods: a narrative review of the scientific evidence in the area of carbohydrates, microbiome, and health. *Food Nutr Res*. 2013;57.

Lawrence R, & Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1976;7:952–958.

Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, Hennekens CH y Buring JE. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005; 294:56–65.

Lee JY, Parks JS. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Curr Opin Lipidol*. 2005 Feb;16(1):19-25.

Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. 2008;13: 1671-1695.



Li YX, Wijesekara I, Li Y, Kim SK. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 2011;46:2219–2224.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868–874.

Liu S, Buring J E, Sesso HD, Rimm EB, Willett WC y Manson JE. A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:49-56.

Livak K y Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 2001;25:402–408.

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen M J, Probstfield J, Fodor G, Held C y Genest J. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1567–1577.

López-López I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz FJ, Cofrades S and Jiménez-Colmenero F. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci.* 2009;83:492-498 .

López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI, Escrich E, Ordovás JM, Soriguer F, Abiá R, de la Lastra CA, Battino M, Corella D, Chamorro-Quirós J, Delgado-Lista J, Giugliano D, Esposito K, Estruch R, Fernandez-Real JM, Gaforio JJ, La Vecchia C, Lairon D, López-Segura F, Mata P, Menéndez JA, Muriana FJ, Osada J, Panagiotakos DB, Paniagua JA, Pérez-Martínez P, Perona J, Peinado MA, Pineda-Priego M, Poulsen HE, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ruano J, Serra-Majem L, Solá R, Solanas M, Solfrizzi V, de la Torre-Fornell R, Trichopoulou A, Uceda M, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F and Yiannakouris N (2010), Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain), *Nutr Metab Cardiovasc.* 2008;20:284-294.

Lourenço R y Camilo ME. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp.* 2002;17:262-270.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Lunn J y Theobald HE. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr Bull.* 2006;31:178-224.
- Mabeau S, Vallat O y Brault D. De L'Orient à L'Occident: les principaux marchés, le charme discret des macro-algues. *Biofutur.* 1990;3:24-29.
- MacIver DH, McNally PG, Ollerenshaw JD, Sheldon TA y Heagerty AM. The effect of short chain fatty acid supplementation on membrane electrolyte transport and blood pressure. *J Hum Hypertens.* 1990:485-490.
- Mahan LK, Escott - Stump S. Krause alimentos, nutrição e dietoterapia / Krause's food, nutrition and diet therapy. São Paulo; Roca, 2008; pp.1157.
- Mahfouz MM and Kummerow FA. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem.* 2000;11:293-302.
- Mai TT, Thu NN, Tien PG, Van Chuyen N (2007) Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 267–276.
- Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autoxidation. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (pp 243–247). Boca Raton: CRC Press Inc.
- Marti A, Corbalan MC, Forga L, Martínez JA, Hinney A, Hebebrand J: Presence of new mutation in the melanocortin-4 receptor in a Spanish population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, 27:385-388.
- Marti A, Corbalán MS, Martínez-González MA, Forga L, Martínez JA: CHO intake alters obesity risk associated with Pro12Ala polymorphism of PPARgamma gene. *J Physiol Biochem* 2002, 58:219-220.
- Martín de Santa Olalla D, Sánchez-Muniz F J and Vaquero M P (2009), N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp*, 24, 2, 113-127.

Martínez de Victoria E, Mañas Almendros M, Yago Torregrosa MD. Fisiología de la digestión. En Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición (Sánchez de Medina F, coordinador). Gil A (ed.). Editorial Panamericana, 2010; Buenos Aires.

Martínez JA, Corbalán MS, Sánchez-Villegas A, Forga L, Martí A, Martínez-González MA: Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. *J Nutr* 2003, 133:2549-2554.

Maruyama H, Watanabe K and Yamamoto I. Effect of dietary Kelp on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nutr Cancer*. 1991;15:221-228.

Mata P, Garrido J A and Ordovás J M (1992), Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women. *Am J Clin Nutr*, 56, 77-83.

Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M and Badimon L (1997), Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 2088-2095.

Mataix Verdú J, Rodríguez J, Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M y López M.: Aceite de oliva y estado oxidativo celular. En: Aceite de Oliva Virgen: nuestro patrimonio alimentario. Mataix Verdú J. Ed. Editorial Universidad de Granada y Puleva Food, 2001; pp. 37-78.

Mataix Verdú J. (2005). Nutrición para educadores. Díaz de Santos. Madrid.

Matsubara K, Sumi H and Hori K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. *Experientia*. 1996;52:540-543.

Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masakki K, Masuda Y and Takeuchi T (1997), A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J Appl Phycol*. 9, 29-35.

Mayer AMS and Hamann MT. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory,

antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol*, 6, 37-52.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;Nov 25;244(22):6049-6055.

Mensink R P and Katan M B (1992), Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb*, 12, 911-919.

Mensink R P, Zock P L, Katan M B and Hornstra G (1992), Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein [a] levels in humans. *J Lipid Res*, 33, 1493-1501.

Metting Jr FB. Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1996;17:477-489.

Michael D. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; Nov, 2002. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono\\_001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001) (acceso Abril, 2009).

Micheletta, F., Luliano, L., 2006. Free Radical Attack on Cholesterol: Oxysterols as Markers of Oxidative Stress and as Bioactive Molecules. *Immunology, Endocrine y Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* 6. 305-316.

Mihara, M., & Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86, 271-278.

Miller GJ y Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*. 1975;1:16-19.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Alimentación. Panel de Consumo Alimentario. (1992/95/97/2001/02 y 2003). La alimentación en España. Madrid.

Miyamoto E, Yabuta Y, Kwak CS, Enomoto T and Watanabe F. Characterization of vitamin B12 compounds from Korean purple laver (*Porphyra* sp.) products. *J Agric Food Chem*. 2009; 57:2793-2796.

Mochizuki H, Takido J, Oda H and Yokogoshi H. Improving effect of dietary taurine on marked hypercholesterolemia induced by a high-cholesterol diet in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63:1984-1987.

Mohamed S, Hashim SN y Rahman AH. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology.* 2012;23:83-96.

Mohamed S, Hashim SN, Rahman, HA. Seeweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol.* 2012;23:83-96.

Monaghan P, Metcalfe NB y Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett.* 2009, 12:75-92.

Moreno-Aliaga MJ, Santos JL, Marti A, Martínez JA: Does weight loss prognosis depend on genetic make up? *Obes Rev* 2004, 6:155-168.

Morgan K, Wright J y Simpson F. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmate* (Dulse). *Econ Bot.* 1980;34:27-50.

Mouritsen OG. (2009). Tang-grøntsager fra havet. Nyt Nordisk Forlag. Arnold Busck, Copenhagen, pp. 284.

Murata M and Nakazoe J. Production and use of marine algae in Japan. *Jpn Agr Res Q.* 2001;35:281-290.

Nakada Y, Kurasawa H, Tohyama J, Inoue Y and Ikewaki K (2007), "Increased remnant lipoproteins in patients with coronary artery disease-evaluation utilizing a newly developed remnant assay, remnant lipoproteins cholesterol homogeneous assay (R3em-C)", *J Atheroscler Thromb*, 14, 56-64.

Nakamura T (1996), Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish Sci*, 62, 923-926.

Nakayama R, Tamura Y, Kikuzaki H and Nakatani N. Antioxidant effect of the constituents of *Susabinori* (*Porphyra yezoensis*). *J Am Oil Chem Soc.* 1999;76:649-653.

Nelson DL y Cox MM. Principios de bioquímica (4ª edición.) Lehninger ed, 2005; Editorial Omega, Barcelona.

Nelson DL y Cox MM: Lehninger Principles of Biochemistry, ed3. New York, Worth Publisher, 2000.

Nestel PJ, Reardon M y Billington T. In vivo transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins in man. *Biochim Biophys Acta*. 1979;573:403-407.

Nichols AV, Gong EL y Blanche PL. Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981;100:391-399.

Nikaido M, Pi J, Jumagai Y, Yamauchi H, Taguchi K, Horiguchi S, Sun Y, Sun G and Shimojo N (2003), "Decreased enzyme activity of hepatic thioredoxin reductase and glutathione reductase in rabbits by prolonged exposure to inorganic arsenate", *Environ Toxicol*, 18, 306-311.

Nishide E and Uchida H. (2003). Effects of alginates on the ingestion and excretion of cholesterol in the rat. In: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison IR (eds), *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*. Oxford University Press, Oxford, pp. 165-168.

Nishide E, Anzai H and Uchida N (1993), "Effects of alginates on the ingestion and excretion of cholesterol in the rat", *J Appl Phycol*, 5, 207-211.

Nishino T and Nagumo T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydr Res*. 1992;229:355-362.

Noda H. Health benefits and nutritional properties of Nori. *J Appl Phycol*. 1993;5:255-258.

Nus M, Sánchez-Muniz F J and Sánchez-Montero J M (2006), "A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid", *Atherosclerosis*, 188, 155-159.

- Nus M, Sánchez-Muniz F J and Sánchez-Montero J M (2007), “Arylesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de un enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I”, *An R Acad Nac Farm*, 74, 5-27.
- Nus M, Sánchez-Muniz F J, Sinisterra Gago J V, Lopez-Oliva E and Sanchez-Montero J M (2008), “Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics”, *Enzyme Microb Tech*, 43, 252-256.
- Nus M, Sánchez-Muniz FJ y Sánchez-Montero JM. A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using Simulated Body Fluid. *Atherosclerosis*. 2006;188:155-159.
- Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sinisterra Gago JV, Lopez-Oliva E y Sánchez-Montero JM. Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics. *Enzyme Microb Tech*. 2008;43,252-256.
- Nus M. Determinación de la actividad arylesterasa e implicaciones y relaciones con el metabolismo lipoproteico y riesgo cardiovascular. Tesis Doctoral, UCM, Madrid, 2007.
- Nwosu F, Morris J, Lund VA, Stewart D, Ross HA., McDougall GJ (2011) Anti-proliferative and potential antidiabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem* 126: 1006–1012.
- Oben J, Enonchong E, Kuate D, Mbanya D, Thomas TC, Hildreth DJ, Ingolia TD and Tempesta MS. The effects of ProAlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids Health Dis*. 2007;6:20.
- Oben J, Enonchong E, Kuate D, Mbanya D, Thomas TC, Hildreth DJ, Ingolia DT, Tempesta MS: The effects of ProAlgaZyme novel algae infusion on metabolic syndrome and markers of cardiovascular health. *Lipids Health Dis* 2007; 6: 20–29.
- Ochoa MC, Marti A, Martínez JA: Obesity studies in candidate genes. *Med Clin (Barc)* 2004, 122:542-551.
- Okuzumi J, Takahashi T, Yamane T, Kitao Y, Inagake M, Ohya K, Nishino H and Tanaka Y (1993), “Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-

N'-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis", *Cancer Lett*, 68, 159-168.

Olivero David R, Schultz-Moreira A, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus M I, González-Muñoz M J and Sánchez-Muniz F J. Effects of Nori- and Wakame-enriched meat with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia, and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br J Nutr*. 2011;106:1476-1486.

Olmedilla-Alonso B, Jiménez-Colmenero F y Sánchez-Muniz FJ. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci*. 2013 Apr 1. doi:pii: S0309-1740(13)00108-3. 10.1016/j.meatsci.2013.03.030. [Epub ahead of print]

Oram JF, Albers JJ, Cheung MC y Bierman EL. The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. Regulation of low density lipoprotein receptor activity. *J Biol Chem*. 1981;256:8348-8356.

Ordovás J M (1999), "The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions", *Proc Nutr Soc*, 58, 171-187.

Ordovas JM, Corella D: Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 71–118.

Ordovas JM: HDL genetics: candidate genes, genome wide scans and gene-environment interactions. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002, 16:273-81.

Ordovas JM: The quest for cardiovascular health in the genomic era: nutrigenetics and plasma lipoproteins. Chadwick R: Nutrigenomics, individualism and public health. *Proc Nutr Soc* 2004, 62:161-6.

Organización Mundial de la Salud: DIETA, NUTRICIÓN Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS. OMS, 2003.

Paglia D y Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70:158-169.



Pando GJD. Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Evaluación del efecto funcional en humanos. Tesis Doctoral, UCM, Madrid, 2012.

Panlasigui LN, Baello OQ, Dimatangal JM and Dumelod BD. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2003;12:209-214.

Papazafiropoulou A K, Kardara M S and Pappas S I (2012), “Pleiotropic effects of omega-3 fatty acids”, *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 6, 40-46.

Park, E.Y., Kim, E.H., Kim, M.H., Seo, Y.W., Lee, J.I., Jun, H.S., 2012. Polyphenol-rich fraction of brown alga *Ecklonia cava* collected from Gijang, Korea, reduces obesity and glucose levels in high-fat diet-induced obese mice. *Evid.Complement. Alternat. Med.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/418912>.

Parks JS y Bullock BC. Effect of fish oil versus lard diets on the chemical and physical properties of low density lipoproteins of nonhuman primates. *J Lipid Res*. 1987;28:173-182.

Patsch JR, Gotto AM Jr, Olivercrona T y Eisenberg S. Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:4519-4523.

Pavia H and Aberg P (1996), “Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta)”, *Hydrobiol*, 326-327, 199-203.

Pérez-Guisado J, Muñoz-Serrano A and Alonso-Moraga A (2008), “Spanish ketogenic Mediterranean diet: a healthy cardiovascular diet for weight loss”, *Nutr J*, 7, 30.

Pérez-Jiménez F, López Miranda J, Pinillos D, Velasco M J, Castro P, Ostos M, Bravo M, Blanco A and Jimenez J (1998), “A high-MUFA and NCEP diet decrease the insulin resistance in young healthy subjects”, *Circulation*, 90, 193S.

Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE , Bouchard C: The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* 2005, 13:381-490.

Pilz S, Tomaschitz A, Ma W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, Pieber T, Lappe J, Grant W B, Holick M F and Dekker J M (2011), “Vitamin D, cardiovascular disease and mortality”, *Clin Endocrinol*, 75, 575–584.

Prosky L (2001), “What is dietary fibre? A new look at the definition”. En: *Advanced dietary fibre technology*. Cleary BV, Prosky, L. Blackwell Science Oxford, UK, pp. 63-88.

Protein	Data	Bank.
<a href="http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&amp;isAuthorSearch=no&amp;radioSet=All&amp;inputQuickSearch=1v04">http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&amp;isAuthorSearch=no&amp;radioSet=All&amp;inputQuickSearch=1v04</a>		

Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X and Li Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2005;37:195-199.

Quanbin Z, Ning L, Xiguang L, Zengqin Z, Zhien L and Zuhong X (2004), “The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity”, *Carbohydr Res*, 339, 105–111.

Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferré P: Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* 1997; 38: 1963–1972.

Ragan MA, Glombitza KW: Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog Phycol Res* 1986; 4: 129–241.

Rajaram OV, White GH y Barter PJ. Partial purification and characterization of a triacylglycerol-transfer protein from rabbit serum. *Biochim Biophys Acta*. 1980;617:383-392.

Ramarathanam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishis T (1995), “The contribution of plant food antioxidant to human health”, *Trends Food Sci Tech*, 6, 75-82.

Reddy K and Katan M B (2004), “Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases”, *Public Health Nutr*, 7, 167-186.

Ren D, Noda H, Amano H, Nishino T and Nishizana K. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of Funoran. *Fish Sci.* 1994b;60:423-427.

Ren D, Noda H, Amano H, Nishino T and Nishizawa K. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish Sci.* 1994a;60:83-88.

Rhode Navarro A, Vera O, Navarro Cruz R, and Ávila Sosa R (2010), “Interacciones alimentos-medicamentos en la tercera edad”, *Revista Salud Publica y Nutrición*, 11, 1; [http://www.respyn.uanl.mx/xi/1/ensayos/interacciones\\_alimentos.htm](http://www.respyn.uanl.mx/xi/1/ensayos/interacciones_alimentos.htm)

Rifici VA y Eder HA. A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for apoprotein AI. *J Biol Chem.* 1984;259:13814-13818.

Rigotti A. Function and regulation of hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI). *International Congress Series.* 2004;1262:527-530. *Atherosclerosis XIII. Proceedings of the 13th International Atherosclerosis Symposium.* doi:10.1016/j.ics.2003.12.007.

Rocha de Souza M, Marques C, Guerra Dore C, Ferreira da Silva F, Oliveira Rocha H and Leite E. Antioxidant activities of sulphated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol.* 2007;19:153-160.

Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, Levy AP, Elias M and Aviram M (2008), Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J Agric Food Chem*, 56, 8704-8713.

Ródenas de la Rocha S, Sánchez-Muniz FJ, Gómez-Juaristi M and Larrea Marín MT. Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *J Food Compos Anal.* 2009;22:330-336.

Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Sevillano MI, Larrea Marín MT, and González-Muñoz MJ. Blood pressure of omnivorous and semi-vegetarian postmenopausal women and their relationship with dietary and hair concentrations of essential and toxic metals. *Nutr Hosp.* 2011;26:874-883.

Ross R (1999), Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Eng J Med*, 340, 115-126.

Rubiés-Prat J. 2000. Manejo de la dislipemia en el paciente diabético”. En: Enfermedades cardiovasculares. Nutrición, genética y epidemiología. Oya M de, Garcés C. (Eds). Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Doyma SL., Madrid, pp. 95-106.

Rubinstein A, Gibson JC, Paterniti JR Jr, Kakis G, Little A, Ginsberg HN y Brown WV. Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1985;75:710-721.

Rupérez P and Saura-Calixto F (2001), “Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds”, *Eur Food Res Technol*, 212, 349-354.

Rupérez P, Ahrazem O and Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem*. 2002;50:840–845.

Rupérez P, Saura-Calixto F (2001) Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *Eur Food Res Technol* 212: 349–354.

Rupérez, P., Ahrazem, O., Leal, J.A., 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem*. 50, 840-845.

Ryan AS, Keske MA, Hoffman JP and Nelson EB Clinical overview of algal-docosahexaenoic acid: effects on triglyceride levels and other cardiovascular risk factors”, *Am J Ther*. 2009;16:183-192.

Saeter, G., Schwarze, P.E., Nesland, J.M., Jull, N., Pettersen, E.O., Seglen, P.O., 1988. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis* 9, 939-945.

Sáez GT, Romero FJ y Viña J. Effects of glutathione depletion on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1985;241:75-80.

Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González M A, Fito M, Estruch R, Corella D, Fiol M; Gomez-Gracia E, Arós F, Flores G, Lapetra J, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutierrez V, Bullo M, Basora J and Covas M I (2008), “Effect of a

Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial”, *Arch Intern Med*, 168, 2449-2458.

Sánchez de Medina F. HDL molecular pathology. *Ars Pharmac*. 2000;41:59-65.

Sánchez-Muniz F J and Nus M (2008), “Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular”, In: *Genética, nutrición y enfermedad*. Vaquero P (coordinadora). Instituto Tomás Pascual Sanz y Consejo Superior de Investigaciones Científicas. EDIMSA, Madrid, pp: 125-144.

Sánchez-Muniz F J, García Linares M C, García Arias M T, Bastida S and Viejo J (2003), “Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats”, *J Nutr*, 133, 2302-2308.

Sánchez-Muniz F J, Maki KC, Schaefer E J and Ordovás J M (2009), “Serum lipids and antioxidant response s in hypercholesterolemic men and women receiving plant sterol esters vary by apolipoprotein E genotype”, *J Nutr*, 139, 13-19.

Sánchez-Muniz F J, Oubiña P, Benedí J, Ródenas S, and Cuesta C (1998), “A preliminary study on platelet aggregation in postmenopausal women consuming extra-virgin olive oil and high-oleic acid sunflower oil”, *J Am Oil Chem Soc*, 75, 217-223.

Sánchez-Muniz F.: Alimentos funcionales: carne y derivados cárnicos. Presente y perspectivas. In: F. Jiménez-Colmenero, F. J. Sánchez-Muniz, & B. Olmedilla (Eds). *La Carne y Productos Cárnicos como Alimentos Funcionales*. Madrid. edittec@red, 2004; pp. 39-58.

Sánchez-Muniz FJ y Bastida Codina S.: Lípidos. En: *Libro Blanco de la Nutrición en España*. Varela Moreiras G (Coordinador general). Fundación Española de la Nutrición y Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid, 2013; pp.113-124.

Sanchez-Muniz FJ, Bastida S. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2008;110:295-301.

Sánchez-Muniz FJ, Cava F, Viejo JM, Bastida S, Higón E y Marcos A. Olive oil fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effects on some serum lipids and cell damage marker enzymes. *Nutr Res*. 1996;16:111-121.

Sánchez-Muniz FJ, García Linares MC, García Arias MT, Bastida S y Viejo J. Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr.* 2003;133:2302-2308.

Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, et al. (2002) Fat and protein from olive oilfried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr* 133, 2302-2308.

Sánchez-Muniz FJ, Higón E, Cava F y Viejo JM. Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J Agric Food Chem.* 1992;40:22-26.

Sánchez-Muniz FJ, Merinero MC, Rodríguez-Gil S, Ordovás JM, Ródenas S and Cuesta C. Dietary fat saturation affects apolipoprotein AII levels and HDL composition in postmenopausal women. *J Nutr.* 2002;132:50-54.

Sánchez-Muniz FJ. (2003). Lípidos, In: Nutrición y Dietética, García-Arias MT & García Fernández MC. (eds.). Universidad de León. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales. León, pp. 119-133.

Sánchez-Muniz FJ. Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *An R Acad Nac Farm.* 2007;73:653-692.

Sanchez-Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2012; 27:40-54.

Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2012 Jan-Feb;27(1):31-45.

Sánchez-Muniz FJ. Funtional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. In: Algae and cardiovascular-health. pp, (2012).

Sánchez-Muniz, F J (1987), “Prevención con dieta para una vida longeva. Relevancia del consumo de pescado”, *Rev Clín Esp*, 180, 43-47.

Sánchez-Muniz, F.J. y Bastida, S. Nutrigenómica y nutrigenética. Desde la expresión génica a las dietas a medida. Unidad 5 Módulo 7. Nutrición en la Mejora del Bienestar y Capacidad Funcional. En: Magíster Universitario. Nutrición y Dietética para la Promoción de la Salud. Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición).

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. COINSA (2010). Depósito Legal M-39937-2009

Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A and Nakano T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats”, *J Agric Food Chem.* 2002;50:6245-6252.

Sáyago-Ayerdi S G, Vaquero P, Schultz-Moreira A, Bastida S and Sánchez-Muniz, F J (2008), “Usefulness and controversial issues of middle-chain fatty acids consumption on lipoprotein metabolism and obesity”, *Nutr Hosp*, 23, 265-276

Schaefer E J (2001), “Lipoproteins, nutrition, and heart disease” At Seminars in Atherosclerosis at Tufts University. Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University. Boston, MA.

Schaefer E J, Gleason J A and Dansinger M L (2009), “Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis”, *J Nutr*, 139, 1257S–1262S.

Schmitz G, Niemann R, Brenhausen B, Krause R y Assman G. Regulation of high density lipoprotein receptors uncultured macrophages, role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase. *EMBO J.* 1985;11:2773-2779.

Schultz Moreira A, González-Torres L, Olivero David R, Bastida S, Benedí J and Sánchez-Muniz FJ. Wakame and Nori in restructured meat included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65:290-298.

Schultz Moreira AR, Benedi J, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ and Sanchez-Muniz FJ. Effects of diet enriched with restructured meats containing *Himanthalia elongata* on the hypercholesterolemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem.* 2011;129:1623-1630.

Seglen, P.O., 1993. Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. In: Tyson CA, Frazier JM, editors. *Methods in toxicology in vitro biological systems*. Academia Press; New York, NY, USA, pp. 231–243.

Sekar S and Chandramoham M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol.* 2008;20:113-136.

Serrano Ríos M, Gutiérrez Fuentes JA (ed.) Type 2 Diabetes Mellitus. Elsevier. Barcelona, 2009; pp 1-339.

Serrano Ríos M, Ordovás JM and Gutiérrez Fuentes JA (eds.) (2011). Obesity, inflammation and the metabolic syndrome In Obesity. Elsevier and Fundacion Lilly, Amsterdam, 2011.

Serrano-Ríos M, Gutiérrez Fuentes JA (ed.). (2009). Type 2 Diabetes Mellitus. Elsevier. Barcelona, pp 1-339.

Shanmugam M and Mody KH. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Curr Sci.* 2000;79:1672-1683.

Shelburne F, Hanks J, Meyers W y Quarfordt S. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest.* 1980;65:652-658.

Sherrill BC y Dietschy JM. Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. *J Biol Chem.* 1978;253:1859-1867.

Sherrill BC, Innerarity TL y Mahley RW. Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. Identity with the chylomicron remnant transport process. *J Biol Chem.* 1980;255:1804-1807.

Shimazu T, Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Sato Y, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y and Tsuji I. Dietary patterns and cardiovascular disease mortality in Japan: a prospective cohort study. *Int J Epidemiol.* 2007; 36:600-609.

Simopoulos AP: Nutrigenetics/nutrigenomics. *Annu Rev Public Health* 2010; 31: 53–68.

Skrovánková S. Seaweed vitamins as nutraceuticals. *Adv Food Nutr Res.* 2011; 64:357-369.

Smith LC, Pownall HJ y Gotto AM Jr. The plasma lipoproteins: Structure and metabolism. *Ann Rev Biochem.* 1978;47:751-777.



Smolin LA y Crosvenor MB. Nutrition. Science & Applications. 3rd edition. Saunders College Publishing. 2000; Forth Worth.

Soutar AK, Garner CW y Baker HN. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidyl-choline acyl donor on the activity of lecitina:colesterol acyltransferase. *Biochem.* 1975;14:3057-3064.

Staessen J A, Wang J G and Thijs L (2001), “Cardiovascular protection and blood pressure reduction: a meta-analysis”, *Lancet*, 358, 1305-1315.

Stamler J, Greenland P, Van Horn L and Grundy S M (1998), “Dietary cholesterol, serum cholesterol, and risks of cardiovascular and noncardiovascular diseases”, *Am J Clin Nutr*, 67, 488-492.

Stein Y, Dabach Y, Hollander G, Halperin G y Stein O. Metabolism of HDL-cholesterol ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleic ester. *Biochim Biophys Acta.* 1983;752:98-105.

Stover PJ: Nutritional genomics. *Physiol Genomics* 2004, 16:161-5.

Streja D, Kallai MA y Steiner G. The metabolic heterogeneity of human very low density lipoprotein triglyceride. *Metabolism.* 1977;26:1333-1344.

Suetsuna K, Maekawa K and Chen JR. Antihypertensive effects of Undaria pinnatifida (Wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 2004;15:267-272.

Suetsuna K. Separation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from peptic digest for Hizikia fusiformis protein. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 1998;64:862-866.

Sundram K, Ismail A, Hayes K C, Jeyamalar R and Pathmanathan R (1997), “Trans (elaidic) fatty acids adversely affect the lipoprotein profile relative to specific saturated fatty acids in humans”, *J Nutr*, 127, 514S-520S.

Tabas J y Tall AR. Mechanism of the association of HDL3 with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 1984;259:13897-13905.

Tabrez, S., Ahmad, M., 2012. Cytochrome P450 system as potential biomarker of certain toxicants: comparison between plant and animal models. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-012-2765-z.

Tall AR, Green PHR, Glickman RM y Riley JW. Metabolic Fate of Chylomicron Phospholipids and Apoproteins in the Rat. *J Clin Invest.* 1979;64:977-989.

Terpend, K., Bisson, J.F., Le Gall, C., Linares, E., 2012. Effects of ID-alG™ on weight management and body fat mass in high-fat-fed rats. *Phytother. Res.* 5, 727–733.

Terpstra A H M, Hermus R J J and West C E (1983), “The role of dietary protein in cholesterol metabolism”, *World Rev Nutr Diet*, 42, 1-55.

Terpstra AH, Sanchez-Muniz FJ, West CE y Woodward JH. The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comp Biochem Physiol.* 1982;71:669-673.

Terpstra AH, Woodward CJ y Sanchez-Muniz FJ. Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem.* 1981;111:149-157.

Terpstra AH. Isolation of serum chylomicrons prior to density gradient ultracentrifugation of other serum lipoprotein classes. *Anal Biochem.* 1985;150:221-227.

Terpstra AH. Isolation of serum chylomicrons prior to density gradient ultracentrifugation of other serum lipoprotein classes. *Anal Biochem.* 1985;150:221-227.

Thiruchenduran, M., Vijayan, N.A., Sawaminathan, J.K., Devaraj, S.N., 2011. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc. Pathol.* 20, 361-368.

Thomas VN, Kim S (2011) Review: Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ Toxicol Pharmacol* 32: 325–335.

Thompson A K, Minihaue A M and Williams C M (2011), "Trans fatty acids, insulin resistance and diabetes, Eur J Clin Nutr, 65, 553-564.

Ticc RR, Setlow RB. (1985). DNA repair and replication in aging. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Tien, Y.C., Liao, J.C., Chiu, C., Huang, T.H., Huang, C.Y., Chang, W.T., Peng, W.H., 2011. Esculetin ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats. Int. J. Mol. Sci. 12,4053-4067.

Toole J F, Malinow M R, Chambless L E, Spence J D, Pettigrew L C, Howard V J, Sides E G, Wang C H and Stampfer M (2004), "Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial", JAMA, 291, 565-575.

Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ and Vaquero MP. Deficiencia y sobrecarga de hierro. Implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2010;25:350-365.

Trujillo E, Davis C, Milner J: Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *J Am Diet Assoc* 2006; 106: 403–413.

Tsuchiya Y. Comparative hypocholesterolemic activities of marine algae. *Proceeding of the International Seaweed Symposium.* 1969;6:747-757.

Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A and Becker PJ. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57:47-53.

Vahouny G, Adamson I, Chalcarz W, Satchithanandam S, Muesing R, Klurfeld D, Tepper S, Sanghvi A and Kritchevsky D. Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis.* 1985;56: 127-137.

Valsta L M, Jauhiainen M, Aro A, Katan M B and Mutanen M (1992), "Effects of monounsaturated rapeseed oil and a polyunsaturated sunflower oil diet on lipoprotein levels in human", *Arterioscler Thromb*, 12, 50-59.

Van Tol A. (1989). Reverse cholesterol transport. En: Cholesterol transport systems and their relation to atherosclerosis. Steinmetz J, Kaffarnik H y Schneider J. Eds. Springer-Verlog, Berlin/Heidelberg, pp. 85-88.

Vanitha A, Narayan MS, Murthy KN and Ravishankar GA. Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella Bardawil* and *Dunaliella Salina*. *Int J Food Sci Nutr*. 2007;58:373-382.

Vaquero M P, Sánchez-Muniz F J, Jiménez-Redondo S, Prats Olivan P, Higuera F J and Bastida S (2010), "Major diet-drug interactions affecting the kinetics characteristics and hypolipidaemic properties of statins", *Nutr Hosp*, 25, 193-206.

Vázquez J and Sánchez-Muniz F J (1994), "Proteína de pescado y metabolismo de colesterol", *Rev Esp Ciencia Tecnol Alim*, 34, 589-608.

Viejo J, García-Linares C, Bastida S, et al. (2003) Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Tech Int* 9, 329-338.

Viejo J, García-Linares C, Bastida S, et al. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Tech Int*. 2003;9:329-338.22.

Viejo J, García-Linares MC, Bastida S, García-Arias MT, Sánchez-Muniz FJ. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int*. 2003;9:329-338.

Viejo J. El pescado azul en el tratamiento de hiperlipemias. Efectos sobre el perfil graso hepático. Tesina, Madrid, 1989.

Viejo, J. M. (1992). Utilización de sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de hipercolesterolemia experimental inducida por dieta (Olive oil fried sardines in the

treatment of dietary induced hypercholesterolemia in the rat). PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

Viejo, J., García-Linares, M. C., Bastida, S., Garcia-Arias, M. T., & Sánchez-Muniz, F. J. (2003). Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Science and Technology International*, 9, 329–338.

Villalobos ME, Sánchez-Muniz FJ, Acín MT, Vaquero MP, Higuera FJ and Bastida S. Similarities, differences and agonisms of pleiotropic effects of statins and omega-3 fatty acids. *Nutr Hosp*. 2010;25:889-909.

Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I., 1983. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* 3, 323–327.

Viña J, Romero FJ, Saez GT y Pallardó FV. Effects of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats. *Experientia*. 1983;39:164-165.

Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU y Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest*. 1985;75:384-390.

Wang J, Zhang QB, Zhang ZS, Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*. 2008;42:127-132.

Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S and Miyamoto E. Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2002;48:325-331.

Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp Biol Med*. 2007;232:1266-1274.

Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, y col. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem*. 1997;272:13597-13607.

Weginwar RG, Enomoto S, Hirunuma R and Ambe S. Correlation between serum cholesterols and trace element uptake in liver, kidney, and blood of hypercholesterolemic mice. *Biol Trace Elem Res*. 2002;86:249-268.

Wei Y, Xu C, Liu Q, Xiao H, Zhao A, Hu Y, Liu L and Zhao L. Effect of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* on blood lipids regulation in mice with high-fat diet. *Nat Prod Res*. 2011; Oct 10. (On line).

Weitzel F, Ursini F y Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1036:88-94.

Welch GN and Loscalzo K. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998; 338:1042-1050.

Werman MJ, Sukenik A and Mokady S. Effects of the marine unicellular alga *Nannochloropsis* sp. to reduce the plasma and liver cholesterol levels in male rats fed on diets with cholesterol. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67:2266-2268.

Whittaker MH, Frankos VH, Wolterbeek AMP and Waalkens-Berendsen DH. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med* 2000;109:600-601.

WHO (2009) Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization, Geneve (Switzerland).

WHO (2011) Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneve (Switzerland).

Wijesinghe WJ, Athukorala Y and Jeon YJ. Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. *Carbohydr Polym*. 2011;86:917-921.

Willett WC: Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science* 2002, 296:695-8.

Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994;344:793-795.

Wong KH, Sam SW, Cheung PCK and Ang PO. Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr Res.* 1999;19:1519-1527.

Xue CH, Chen L, Li ZJ, Cai YP, Lin H and Fang Y. Antioxidative activities of low molecular fucoidans from Kelp *Laminaria japonica*. *Dev Food Sci.* 2004;42:139-145.

Yan X J, Chuda Y, Suzuki M and Nagata T (1999), Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 605-607.

Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J and Zeng X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the Brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem.* 2008;111:428-432.

Ye J. 2011. Obesity, inflammation and the metabolic syndrome. In *Obesity*. Serrano Ríos M, Ordovás J M, Gutiérrez Fuentes J A (eds.), Elsevier and Fundacion Lilly, Amsterdam, pp. 169-188.

Yoon NY, Kim HR, Chung HY and Choi JS. Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Arch Pharm Res.* 2008;31:1564-1571.

Yoshie Y, Suzuki T, Shirai T and Hirano T (1994), Changes in the contents of dietary fibres, minerals, free amino acids, and fatty acids during processing of dry Nori. *Nippon Suisan Gakk*, 60, 117-123.

Yoshie Y, Wang W, Petillo D and Suzuki T. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fish Sci.* 2000;66:998-1000.

Young SA, Hung SC, Anderson WH, Albers DR, Langhorst ML, Yokoyama W: Effects of cationic hydroxyethyl cellulose on glucose metabolism and obesity in a diet-induced obesity mouse model. *J Diabetes* 2012; 4: 85–94.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74:139-162.

Yuan Y V, Carrington M F and Walsh N A (2005), "Extracts from Dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro", *Food Chem Toxicol*, 43, 1073-1081.

Zhang CY, Wu WH, Wang J and Lan MB. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.) and its effects on calcium oxalate crystallization. *Mar Drugs*. 2012;10:119-130.

Zhang JX, Hallmans G, Andersson H, Bosaeus I, Aman P, Tidehag P, Stenling R, Lundin E and Dhlgren S. Effect of oat bran on plasma cholesterol and bile acid excretion in nine subjects with ileostomies. *Am J Clin Nutr*. 1992;56:99-105.

Zhang Q, Ning L, Gefei Z, Xiaolan L and Zuhong X. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol Res*. 2003;48:151-155.

Zhang Q, Ning L, Xiguang L, Zengqin Z, Zhien L and Zuhong X (2004), The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydr Res*, 339, 105-111.

Zhao X, Xue CH, Li ZJ, Cai YP, Liu HY y Qi H. Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *J Applied Phycol*. 2004;16:111-115.

Zhou H, Li Z, Silver LD, Jiang XC. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:1482–1488.

Zhuang C, Itoh H, Mizuno T y Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thumbergii*). *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995;59: 563-567.